

**Pathogenetische Bedeutung von Advanced
Glycation Endproducts (AGEs) bei der renalen
Osteodystrophie.**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der Friedrich-
Schiller-Universität Jena

von Anne Roßner
geboren am 27. März 1981 in Wolgast

Gutachter:

1. Prof. Dr. G. Stein, Jena
2. Frau PD Dr. G. Lehmann
3. Prof. Dr. P. Jehle, Wittenberg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1.11.2011

Abkürzungsverzeichnis

AEC-Lösung	Aminoethylcarbazol - Lösung
AGEs	Advanced Glycation Endprodukts
ARBD	Adynamic Renal Bone Disease
BMMs	Bone Marrow Macrophages
BV/TV%	Bone Volume/Total Volume
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPD	Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder
CML	N ϵ -Carboxymethyllysine
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CSF-1	Colony Stimulating Factor- 1
DEXA	Dual Energy X-Ray Absorptiometrie
ES/BS%	Anteil der Resorptionsoberfläche an der Endostoberfläche
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
HPT	Hyperparathyreoidismus
iPTH 1-84	Intaktes Parathormon
IL 6/11	Interleukin 6/11
IGF-1	Insulin like Growth Faktor 1
IGFBPs	Insulin like Growth Faktor Bindungsproteine
KIDGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KDOQI	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
MS/BS	Mineralizing Surface/ Bone Surface
MAR $\mu\text{m}/\text{d}$	Mineralappositionsrate
MOF	milde Osteitis fibrosa
mRNA	messenger RiboNucleic Acid
MUD	gemischte urämische Osteodystrophie
OV/BV%	Osteoidanteil der Endostoberfläche
Obs/BS%	Osteoblast Surface/ Bone Surface
Oth μm	Osteoidsaumbreite
OcS/BS%	Osteoclast Surface/ Bone Surface

PTH	Parathormon
RAGE	Receptor of Advanced Glycation Endprodukts
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
ROD	Renale Osteodystrophie
sHPT	sekundärer Hyperparathyreoidismus
sRAGE	soluble Receptor of Advanced Glycation Endprodukts
TGF β	Transforming growth factor β
TRAP	tartratresistente saure Phosphatase

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
Zusammenfassung	VI
1. Einleitung	- 1 -
2. Grundlagen	- 2 -
2.1 Knochengewebe	- 2 -
2.1.1 Erklärung Knochenmodeling und -remodeling.....	- 2 -
2.1.2 Den Knochenstoffwechsel regulierende Hormone und Wachstumsfaktoren	- 3 -
2.1.2.a Hormone	- 3 -
2.1.2.b Wachstumsfaktoren	- 4 -
2.2 Niereninsuffizienz	- 5 -
2.2.1 Pathogenese, Einteilung und Folgeerscheinungen	- 5 -
2.3 Knochenstoffwechsel bei Niereninsuffizienz und sekundärer Hyperparathyreoidismus ..	- 7 -
2.4 Renale Osteodystrophie.....	- 8 -
2.4.1 Diagnostik der ROD und leitliniengerechte Therapie der chronischen	
Niereninsuffizienz entsprechend der KDIGO-Guidelines (2006).....	- 10 -
2.4.1.a Kontrollabstände der Laborwerte und Therapie der Stoffwechselentgleisungen.....	- 10 -
- CNI Stadium 3 und 4	- 10 -
- Therapie der CNI Stadium 5	- 11 -
2.4.1.b Radiologie	- 14 -
2.4.1.c Histologie	- 14 -
2.5 Advanced Glycation Endproducts.....	- 15 -
2.5.1 Definition, Entstehung, Vorkommen	- 15 -
2.5.2 Bedeutung.....	- 16 -
2.5.3 Entstehung von AGEs (CML/Imidazolon)	- 17 -
3. Fragestellung	- 20 -
4. Material und Methoden	- 21 -
4.1 Patienten	- 21 -
4.2 Knochenbiopsie, Herstellung der Knochenschnitte, Histomorphometrie.....	- 23 -
4.3 Immunhistochemie zum Nachweis von CML und Imidazolon	- 24 -
4.4 Digitalisierung und Densitometrie	- 25 -
4.5 Statistik.....	- 25 -
5. Ergebnisse	- 26 -
5.1 Färbeverhalten und Beispiele immunhistochemischer Färbungen.....	- 26 -
Renale Osteodystrophie.....	- 26 -
Hyperparathyreoidismus CML und Imidazolon:	- 26 -
Adyname Form CML und Imidazolon:.....	- 27 -
5.2. Densitometrie	- 28 -
5.2.1 Zusammenhänge zwischen densitometrischen Daten und Histomorphometrie- sowie	
laborchemischen Parametern.....	- 32 -
6. Diskussion	- 43 -
Literaturverzeichnis.....	- 50 -
Anleitungen und Vorschriften	- 58 -
Danksagung	- 62 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnoseverteilung aller bei QuaSi-Niere erfassten lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie (Prävalenz) 2006	- 6 -
Abbildung 2: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahresvergleich (QuaSi-Niere 2006)	- 6 -
Abbildung 3: Alternative Wege der Maillard Reaktion von Glukose. Die Bildung von AGEs wird durch die Oxidation und Fragmentierung von Zucker oder seinen Addukten an Proteine katalysiert. Diese Reaktionen werden durch ROS (reactive oxygen species) und Peroxynitrite katalysiert (Thorpe Baynes 2003).	- 15 -
Abbildung 4: Nichtenzymatische Synthese von 3-DG und AGEs bei der Maillard Reaktion (Niwa et al. 1997).	- 17 -
Abbildung 5: Entstehung von Imidazolon A und B durch in vitro Inkubation von 3-DG mit einem Arginin Derivat. (Niwa et al. 1997).....	- 18 -
Abbildung 6: Arbeitshypothese über die HMGB1 Regulation der Osteoklastogenese (Zhou et al. 2008).	- 19 -
Abbildung 7: Pat. 8922, anti-CML 1:150000, 10x	- 26 -
Abbildung 8: Pat. 8906, anti-Imidazolon 1:10000, 10x	- 27 -
Abbildung 9: Pat. 9083: anti-Imidazolon 1:10000, 10x	- 27 -
Abbildung 10: Pat. 9068: anti-CML 1:150000, 10x	- 28 -
Abbildung 11: Hyperparathyreoidismus Pat. 8894 anti-CML, 1:150000; 200 x.....	- 29 -
Abbildung 12: Hyperparathyreoidismus Pat. 8894 anti-Imidazolon, 1:10000; 200x	- 30 -
Abbildung 13: Adyname Form Pat.8868 anti-Imidazolon 1:10000, 200x.....	- 31 -
Abbildung 14: Adyname Form Pat 8868 anti-CML 1:150000; 200x	- 31 -
Abbildung 15: Korrelation CML-/Imidazolon-Anfärbung im Knochen.....	- 33 -
Abbildung 16: Korrelation histomorphometrische Diagnose (1= Osteitis Fibrosa, 2=Adyname Form) mit CML-Ablagerung.....	- 34 -
Abbildung 17: Korrelation CML-Ablagerung mit OV/BV	- 35 -
Abbildung 18: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit OV/BV	- 35 -
Abbildung 19: Korrelation CML-Ablagerung mit OS/BS	- 36 -
Abbildung 20: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit OS/BS	- 36 -
Abbildung 21: Korrelation CML-Ablagerung mit ObS/BS	- 37 -
Abbildung 22: Korrelation-Ablagerung Imidazolon mit ObS/BS	- 37 -
Abbildung 23: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit Oth	- 38 -
Abbildung 24: Korrelation CML-Ablagerung mit ES/BS	- 39 -
Abbildung 25: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit ES/BS.....	- 39 -
Abbildung 26: Korrelation CML-Ablagerung mit OcS/BS	- 40 -
Abbildung 27: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit OcS/BS.....	- 40 -
Abbildung 28: Korrelation CML-Ablagerung mit iPTH	- 41 -
Abbildung 29: Korrelation CML-Ablagerung mit BioPTH.....	- 42 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz entsprechend der NKF	- 7 -
Tabelle 2: Histologische Klassifikationen der renalen Osteodystrophie (nach Hruska Teitelbaum, NEJM, 1995).....	- 9 -
Tabelle 3: Bestimmungshäufigkeit von iPTH, Kalzium und Phosphat in Abhängigkeit vom Stadium der chronischen Nierenerkrankung Entsprechend der K/DOQI Guidelines 2006 -	10 -
Tabelle 4: Bestimmungshäufigkeit von iPTH, Kalzium und Phosphat im Stadium 5 der chronischen Nierenerkrankung Entsprechend der K/DOQI Guidelines 2006	- 12 -
Tabelle 5: Zielwerte der K/DOQI-Guidelines (2006) für den Knochenstoffwechsel bei chronischer	- 13 -
Tabelle 6: Altersverteilung bei den histomorphometrischen Diagnosen	- 21 -
Tabelle 7: Patientendaten beider Gruppen der renalen Osteopathie. (TNI= terminale Niereninsuffizienz, CNI= chronische Niereninsuffizienz, pTNI=präterminale Niereninsuffizienz; Typ I= Osteitis fibrosa; Typ IV= Adynamie Form)	- 22 -
Tabelle 8: Hyperparathyreoidismus Mittelwerte Graustufen CML-/Imidazolonfärbung (in μm^3)	- 32 -
Tabelle 9: Adynamie Form Mittelwerte Graustufen CML-/Imidazolonfärbung	- 32 -

Zusammenfassung

Die renale Osteodystrophie entsteht schon in frühen Stadien der Niereninsuffizienz. Die Niereninsuffizienz verursacht eine Kumulation von Advanced Glycation Endproducts (AGEs), da diese hauptsächlich durch die Nieren ausgeschieden werden. AGEs lagern sich bevorzugt an langlebigen Proteinen/ Geweben möglicherweise auch im Knochen ab, da dieser zu großen Teilen aus Kollagen besteht. Die Hauptfrage der Arbeit war, ob sich AGEs wie CML und Imidazolon im Knochen von Patienten mit verschiedenen Formen der renalen Osteodystrophie nachweisen lassen und pathogenetische Faktoren der Knochenveränderungen darstellen. Es wurden die Knochenbiopsien von 30 Patienten untersucht, davon 21 mit Hyperparathyreoidismus und 9 Patienten mit adynamer Form. Die Patienten waren zwischen 25 und 68 Jahre alt. Die Knochenbiopsien wurden zur Therapiefestlegung und vor Nierentransplantation entnommen und routinemäßig histomorphometrisch, entsprechend der American Society of Bone and Mineral Research Nomenklatur, ausgewertet. Dann wurden die Knochenbiopsien immunhistochemisch mit Anti-Imidazolon und Anti-CML Antikörpern gefärbt und lichtmikroskopisch sowie densitometrisch ausgewertet. Beide AGEs waren im Knochen nachweisbar, wobei sich differente Ablagerungsmuster zeigten. Dies ist möglicherweise durch die differenten Entstehungswege der beiden AGEs bedingt; CML entsteht oxidativ und Imidazolon nichtoxidativ. Imidazolon lagerte sich insbesondere in den Trabekeln ab, das Mark blieb wenig gefärbt; CML hingegen zeigte eine stärkere Färbung der Knochenmarksstrukturen, welche eher oxidativen Vorgängen unterliegen.

Es zeigte sich eine Korrelation der AGE-Ablagerung zur histomorphometrischen Diagnose.

Bei der adynamen Form der renalen Osteodystrophie waren beide AGEs deutlich stärker abgelagert, da das Knochengewebe durch den verminderten/fehlenden Umbau des Knochens wesentlich längere Zeit den AGEs ausgesetzt ist.

Es zeigten sich Korrelationen der AGE-Ablagerung zu Parametern der Osteoklastenleistung (ES/BS). Daraus lässt sich die Hypothese formulieren, dass AGEs die Osteoklastogenese und damit die Knochenresorption steigern.

Es bestand eine negative Korrelation für die Imidazolonablagerung zur Osteoidsaumbreite; daraus kann geschlussfolgert werden, dass mit steigender AGE-Beladung die Knochenneubildung sinkt.

Die Korrelationen der AGE-Ablagerung mit der Osteoblasten- und Osteoklasten besetzten Oberfläche sind wahrscheinlich durch die zytoplasmatischen Ablagerungen in beiden Zellen bedingt.

Diese Ergebnisse lassen eine pathogenetische Bedeutung der AGEs bei der Entstehung der verschiedenen Formen der renalen Osteodystrophie möglich erscheinen.

Mögliche methodische Fehler sind zwei notwendige Färbungsansätze, wodurch die unterschiedlichen Anfärbeintensitäten beeinflusst sein können. Außerdem könnten durch die kleine Patientenzahl Verzerrungen entstanden sein.

Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, welche eine größere Patientenzahl und andere Einflussfaktoren wie Dialyseart, Dialysemembran, die Gabe von AGE-Hemmern einbeziehen.

1. Einleitung

Die chronische Niereninsuffizienz ist zu einem signifikanten Gesundheitsproblem geworden. 66508 Patienten wurden im Jahr 2006 in Deutschland dialysiert. Im Vergleich zum Vorjahr entspricht das einem Anstieg von 4,7%, verglichen mit dem Jahr 1995 einem Anstieg von fast 38% (41350 Dialysepatienten) (Frei Schober-Halstenberg 2008).

Fast 11% der erwachsenen amerikanischen Bevölkerung leiden gegenwärtig an einer chronischen Niereninsuffizienz (Gal-Moscovici Sprague 2007).

Die chronische Niereninsuffizienz ist eine langsam fortschreitende Erkrankung mit einem zunehmenden Nierenfunktionsverlust. Laut Leitlinien der National Kidney Foundation (KDOQI Practice Guidelines) ist die chronische Niereninsuffizienz durch einen Abfall der glomerulären Filtrationsrate auf $<60\text{ ml/min/1,73 m}^2$ für mindestens drei oder mehr Monate definiert (Bailie et al. 2006). Dieser Abfall der GFR tritt erst ab einem Nierenfunktionsverlust von 50% auf. Eine gute Vorsorge und eine engmaschige ärztliche Überwachung und Therapie von Risikopatienten, beispielsweise Diabetikern, kann den Verlauf verhindern bzw. verzögern.

Eine Dialyse ist ab dem Stadium 5 der chronischen Niereninsuffizienz ($\text{GFR} <15\text{ ml/min}$) erforderlich. Die Hauptursachen, die im Jahr 2006 zum terminalen Nierenversagen und damit zu einer Dialysebehandlung in Deutschland geführt haben, sind die diabetische Nephropathie bei Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2 und eine chronische Glomerulonephritis (Frei Schober-Halstenberg 2008).

Durch die Niereninsuffizienz kommt es zu einem Vitamin D- Mangel, zu Veränderungen der Elektrolyte Kalzium und Phosphat im Serum und zu einer Erhöhung des Parathormonspiegels. Zusammen mit weiteren Faktoren, die das Knochenremodeling beeinflussen, entstehen die verschiedenen Formen der renalen Osteodystrophie.

Die renale Osteodystrophie wird bereits bei 75-100% der Patienten, die eine glomeruläre Filtrationsrate unter 60 ml/Minute haben, festgestellt (Elder 2002). Die ossären Veränderungen auf der Gewebsebene manifestieren sich schon zu einem frühen Zeitpunkt der Erkrankung (Rix et al. 1999).

Die renale Osteodystrophie wird in high turnover und low turnover Varianten eingeteilt. Zu den high turnover Formen zählen Osteitis fibrosa (sekundärer Hyperparathyreoidismus; HPT) und die gemischte urämische Osteodystrophie (HPT + Mineralisationsstörung). Osteomalazie und die adynamie renale Knochenerkrankung gehören zu den low turnover Formen.

Übergänge oder andere Manifestationen der renalen Osteodystrophie sind im Verlauf der Erkrankung möglich.

Die häufigste Ursache der renalen Osteodystrophie ist der sekundäre Hyperparathyreoidismus mit seinen typischen Knochenveränderungen, gefolgt von der gemischten Osteodystrophie, den low turnover Erkrankungen und der Osteomalazie (Elder 2002, Lehmann et al. 2008).

Advanced Glycation Endprodukts (AGEs) wird eine pathogenisierende Rolle bei den Knochenveränderungen zugeschrieben. Sie werden ständig mit der Nahrung aufgenommen oder entstehen durch Glykierung von Proteinen und Peptiden, besonders während Abbauvorgängen im Körper; sie werden hauptsächlich renal eliminiert. Kommt es zu einem Ausfall der Nierenfunktion, kumulieren AGEs im Körper und lagern sich in Geweben ab (Makita et al. 1991). Stoffwechselträge Gewebe wie Bindegewebe und Knochen sind davon besonders betroffen. In vitro Studien zeigten eine durch AGEs induzierte Osteoklastogenese, gestörte Matrixmineralisation und Veränderungen der Adhäsion von Osteoblasten an der Matrix (Franke et al. 2007, Hein et al. 2006, McCarthy et al. 2001 a, McCarthy et al. 2004).

Weiterhin wurden Einflüsse von AGEs auf die Stimulation der IL 6 Produktion und damit ein Einfluss auf das Knochenremodeling beschrieben (Takagi et al. 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob und wo Advanced Glycation Endproducts im Knochen Gesunder, vor allem aber niereninsuffizienter Patienten abgelagert werden und welche Einflüsse auf die Knochenveränderungen ausgeübt werden.

2. Grundlagen

2.1 Knochengewebe

2.1.1 Erklärung Knochenmodeling und -remodeling

Das Knochengewebe unterliegt ständigen Auf- und Abbauvorgängen durch Osteoblasten und Osteoklasten. Diese Vorgänge laufen bis zu einem Alter von etwa 30-35 Jahren ab, anschließend kommt es zu einer Reduktion der Skelettmasse von circa 1% pro Jahr. Wird Knochen stärker als im physiologischen Rahmen reduziert, entsteht eine Osteoporose. Das Skelettsystem stellt den größten Kalziumspeicher des Körpers dar, 99% des Kalziums lagern im Knochen, nur 1% befinden sich gelöst im Blut. Der Knochenumbau wird durch hormonelle und mechanische Faktoren reguliert und kann in vier Phasen eingeteilt werden.

Zu Beginn der Knochenneubildung differenzieren in der Abbauphase Osteoklasten aus aktivierten Knochenmarkvorläuferzellen. Die Osteoklasten lagern sich in Gruppen an die

durch Enzyme (z.B. Kollagenasen) freigelegte Knochenoberfläche an, dort scheiden sie Protonen und lysosomale Enzyme aus und lösen so den Knochen und die organische Matrix auf. So werden Kalzium, Osteocalcin (Matrixprotein) und verschiedene Degradationsprodukte aus Kollagenfibrillen freigesetzt. Der Resorptionsprozess verlangsamt sich nach etwa 4 Wochen, und es lagern sich Makrophagen in die entstandene Resorptionlakune an.

In der Umschaltphase besiedeln Osteoblasten die Knochenoberfläche.

Während der Aufbauphase sezernieren Osteoblasten Osteoid, welches mineralisiert wird. Entscheidend hierbei ist die alkalische Phosphatase, sie setzt anorganisches Phosphat aus organischen Verbindungen der Matrix frei und reagiert mit Kalzium zu Hydroxylapatit. Je nach Mineralisationsgrad und dem Anteil kollagener Fasern stehen die Zugfestigkeit oder die Druckfestigkeit des Knochengewebes im Vordergrund. Osteocalcin reguliert die Mineralisation. Die Funktion der Osteoblasten und deren Stimulation durch lokal gebildete und systemisch vorhandene Hormone und Wachstumsfaktoren haben einen direkten Einfluß auf die Menge und Qualität des neugebildeten Knochens.

In der abschließenden Ruhephase werden aus aktiven Osteoblasten wieder ruhende Osteozyten, sog. Belegzellen. Die Dauer eines Zyklus beträgt etwa drei bis vier Monate (Deuber 2001, Hruska 1998, Malluche Faugere 1990, Ureña et al. 1996).

2.1.2 Den Knochenstoffwechsel regulierende Hormone und Wachstumsfaktoren

2.1.2.a Hormone

Die hormonelle Regulation erfolgt über Parathormon, Calcitonin und 1,25-Dihydroxycholecalciferol.

Parathormon wird in der Nebenschilddrüse gebildet, basal und pulsatil in Abhängigkeit vom Kalziumspiegel sezerniert und über die Niere abgebaut.

Intaktes Parathormon (iPTH 1-84) ist die aktive Form des Hormons und macht 70-90% der zirkulierenden Hormonmenge im Blut aus. Die Hauptaufgabe des Parathormons besteht darin, eine Hypokalzämie zu vermeiden.

In der Niere sorgt das Parathormon für eine Wiederaufnahme von Kalzium, es steigert die Ausscheidung von Phosphat und stimuliert die Synthese von 1,25 Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol). Im Knochen mobilisiert es Kalzium, indem es über das Adenylatzyklase c-AMP System Stomazellen und Osteoblasten zur Freisetzung von Faktoren anregt, die zum einen reife Osteoklasten direkt aktivieren und zum anderen die Proliferation und Differenzierung

von Osteoklastenvorläufern fördern. Intermittierend hohe PTH- Konzentrationen fördern die Knochenneubildung durch Vermehrung von Osteoblastenvorläuferzellen und die osteoblastäre Synthese von IGF 1. Permanent hohe PTH-Spiegel hemmen die Syntheseleistung von Osteoblasten und wirken indirekt stimulierend auf Osteoklasten durch die Sekretion von Prostaglandinen.

Calcitonin wird in den C-Zellen der Schilddrüse gebildet, es dämpft die Osteoklastenaktivität und regt die Funktion und Proliferation von Osteoblasten an. In der Niere hemmt es die Ausscheidung von Kalzium und Phosphat, außerdem regt es die Calcitriolsynthese über eine Steigerung der 1α – Hydroxylaseaktivität an.

Calcitriol, das aktive Vitamin D-Hormon, entsteht über mehrere Zwischenschritte. In der Leber wird Provitamin D gebildet. Provitamin D wird unter Einwirkung von Cholecalciferol (welches unter UV-Wirkung in der Haut gebildet wird) an Position C25 hydroxyliert, es entsteht dadurch 25-Hydroxycholecalciferol. Dieses wird in der Niere an Position C1 hydroxyliert, sodass 1,25 Dihydroxycholecalciferol (Calcitriol) entsteht. Calcitriol ist die wichtigste aktive Form des Vitamin D.

Im Darm steigert Vitamin D die Aufnahme von Kalziumionen aus der Nahrung. In der Niere aktiviert es die Rückresorption von Kalzium und Phosphat im distalen Tubulus. Im Knochen wirkt es ähnlich wie das Parathormon. Der 1α hydroxylierte Metabolit spielt eine wichtige Rolle für die normale Mineralisation des Osteoids und wirkt sowohl auf Osteoblasten als auch auf Osteoklasten. Die Bildung von Knochenmatrix durch Osteoblasten wird in physiologischer Konzentration gesteigert. Bei hohen Vitamin D Konzentrationen wird die Bildung neuer Knochenmatrix nicht nur gehemmt, sondern die Knochenresorption wird über die Stimulation der Differenzierung von Monozyten zu Osteoklasten gefördert (Deuber 2001, Felsenfeld Llach 1993, Hruska 1998).

2.1.2.b Wachstumsfaktoren

Zu den lokalen Faktoren zählen Wachstumsfaktoren und Zytokine, zum Beispiel Interleukin 6 und 11, IGF-1 und -2, TGF β . Osteoprotegerin hemmt die Knochenresorption. Makrophagenkoloniestimulierende Faktoren wie CSF-1 rekrutieren Osteoklasten (Coen et al. 2002, Ferreira 2006).

TGF β senkt die resorptive Aktivität von Osteoklasten und lockt Osteoblasten in Resorptionslakunen. Mit diesem Vorgang startet über die Aktivierung der Osteoblasten der Zyklus des Knochenremodeling. Die Expression wird über verschiedene Hormone wie

beispielsweise PTH, Calcitriol, Glukokortikoide und auch durch mechanische Belastung gesteuert.

IGF-1 und -2 sind wichtige anabole Regulatoren im Knochenstoffwechsel, sie werden in der Leber in Abhängigkeit vom Wachstumshormonspiegel und Ernährungsstatus gebildet. Insulin like Growth Faktors vermitteln mitogene (über IGF-1 Rezeptoren) und zelldifferenzierende Effekte über Bindung an spezielle Rezeptoren. Ihr Transport im Blut erfolgt über Bindungsproteine (IGFBPs). Diese Proteine stellen die wichtigsten Regulatoren der IGF-Wirkung am Knochen dar. Lokal im Knochen gebildete IGFBPs werden durch spezifische Proteasen reguliert, welche zum Teil auch durch Knochenzellen sezerniert werden. Diese Proteasen spalten die Bindungsproteine und setzen so IGF frei. Im Knochengewebe senken IGFs den Kollagenabbau, steigern die Matrixablagerung und rekrutieren osteoblastäre Zellen. Während der aktiven Matrixbildung und des Remodeling-Zyklus werden Insulin like Growth Faktors am stärksten exprimiert. Sowohl IGFs und auch IGFBPs werden in großen Mengen in die Matrix eingebaut und bei späteren Zyklen wieder freigesetzt. Osteoblasten binden vor allem IGF 2. Der Gehalt an IGF nimmt parallel zur Knochendichte mit zunehmendem Alter ab (Deuber 2001, Ferreira 1998).

2.2 Niereninsuffizienz

2.2.1 Pathogenese, Einteilung und Folgeerscheinungen

Die chronische Niereninsuffizienz ist definiert als Nierenschaden oder Absinken der glomerulären Filtrationsrate $<60\text{ ml/min/1,73m}^2$ für mindestens drei oder mehr Monate (Bailie et al. 2006). Es kommt jedoch erst zu einem Anstieg der Retentionswerte im Serum, wenn mehr als 50% des Nierengewebes funktionslos geworden sind und die glomeruläre Filtrationsrate unter 60 ml/min abgefallen ist.

Die Hauptursachen für eine dialysepflichtige chronische Niereninsuffizienz in Deutschland sind laut Quasi-Niere 2006: diabetische Nephropathie, primäre und sekundäre Glomerulonephritiden, interstitielle Nephritiden, vaskuläre (hypertensive) Nephropathien und polyzystische Nierenerkrankungen (Frei Schober-Halstenberg 2008) (siehe Abbildung 1 und 2).

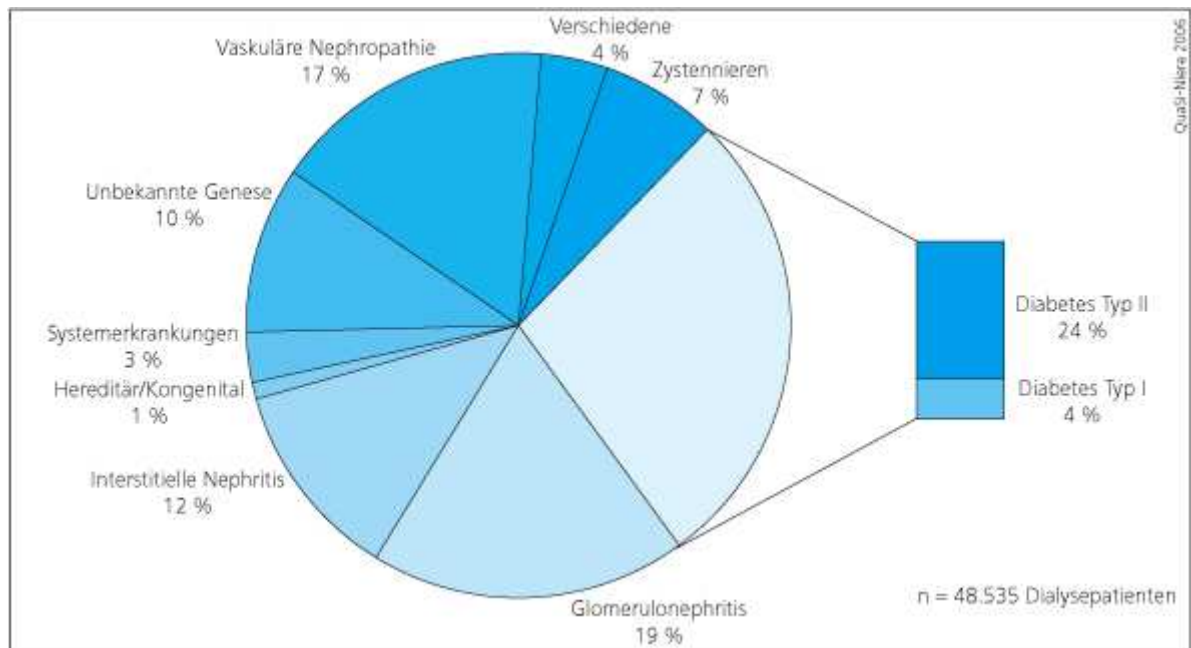


Abbildung 1: Diagnoseverteilung aller bei QuaSi-Niere erfassten lebenden Dialysepatienten in Nierenersatztherapie (Prävalenz) 2006

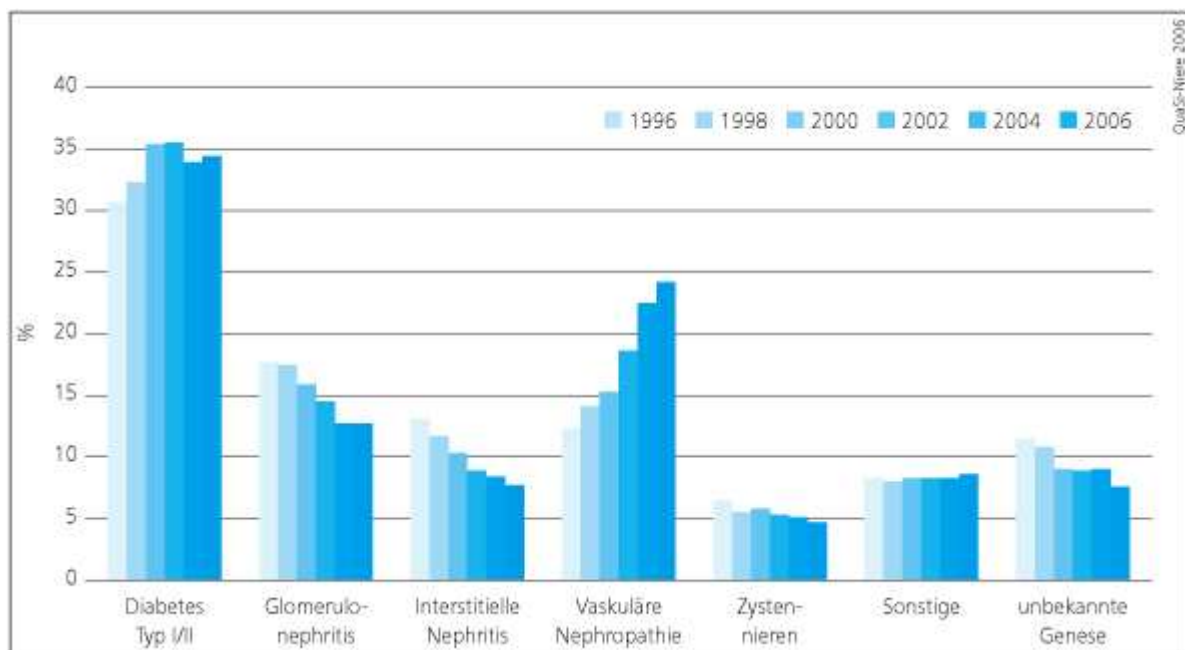


Abbildung 2: Diagnoseverteilung der Patienten bei Therapiebeginn (Inzidenz) im Jahresvergleich (QuaSi-Niere 2006)

Folgen der chronischen Niereninsuffizienz sind ein Versagen der exkretorischen und Abnahme der inkretorischen Nierenfunktion. Es kommt zu Störungen des Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalts. Außerdem kommt es zu toxischen Organschäden durch die nicht ausgeschiedenen harnpflichtigen Substanzen.

Die Einteilung der Stadien der chronischen Niereninsuffizienz entsprechend der National Kidney Foundation (NKF-KDOQI) Practice Guidelines ist in Tabelle 1 aufgeführt

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz entsprechend der NKF

Stadium	Beschreibung	GFR (ml/min/1,73m ²)
1	Nierenschaden mit normaler oder GFR \uparrow	≥ 90
2	Nierenschaden mit mildem GFR \downarrow	60-89
3	Mäßiger GFR \downarrow	30-59
4	Starke GFR \downarrow	15-29
5	Nierenversagen	<15 (oder Dialyse)

2.3 Knochenstoffwechsel bei Niereninsuffizienz und sekundärer Hyperparathyreoidismus

Infolge der sich verschlechternden Nierenfunktion sinkt die Bildung von Calcitriol aus Calcidiol deutlich ab. Ursächlich dafür ist die abnehmende 1α - Hydroxylase-Aktivität durch eine Zerstörung der Nephrone. Durch eine Hypokalzämie wird die Nebenschilddrüse angeregt, Parathormon zu bilden und auszuschütten, dadurch kommt es zu einer Hyperplasie und zum monoklonalen Wachstum der Nebenschilddrüsenzellen mit Reduktion der Vitamin D-Rezeptoren und der Beeinflussbarkeit durch Kalzium (Fukuda et al. 1993). Aufgrund des Calcitriolmangels entfällt die negative Rückkoppelung des Parathormons, da hohe Calcitriolmengen regulär PTH supprimieren würden. So entsteht ein sekundärer Hyperparathyreoidismus. Durch die gesteigerte Parathormonproduktion kann der Serumkalziumspiegel über einen längeren Zeitraum im Normalbereich gehalten werden. Jedoch geht dieser Mechanismus zu Lasten des Knochens, da das fehlende Kalzium aus dem Knochen mobilisiert wird (Malluche et al. 1976).

Durch die Niereninsuffizienz steigt auch der Phosphatpiegel im Serum deutlich an, dadurch wird die PTH- Sekretion stimuliert; dieses hemmt die 1α - Hydroxylase-Aktivität, wodurch die Calcitriolsynthese stark verringert wird.

Bei der Niereninsuffizienz kommt es außerdem zu einer metabolischen Azidose. Die gleichfalls die 1α - Hydroxylase-Aktivität hemmt und eine Aktivierung von Osteoklasten und eine weitere Kalziumfreisetzung aus dem Knochen bewirkt. Auch die IGFBNs spielen eine Rolle bei der Pathologie im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz. Besonders ein

Anstieg des Serumspiegels von IGFBP 4 scheint charakteristisch für das chronische Nierenversagen zu sein (Felsenfeld Llach 1993, Jehle et al. 2000, Locatelli et al. 2002, Martin González 2007, Rix et al. 1999).

2.4 Renale Osteodystrophie

Die Definition der Renalen Osteodystrophie (ROD) entsprechend der KIDGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) lautet:

„ROD ist eine Veränderung der Knochenstruktur bei Patienten mit chronischem Nierenversagen. Es ist eine Messgröße der Skelettkomponente der bestehenden systemischen Funktionsstörung, bei der CKD-MBD (Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder), welche durch Knochenbiopsie mit Histomorphometrie quantifizierbar ist“.

Definition der CKD-MBD: „Veränderungen des Kalzium-, Phosphat-, Parathormon- oder Vitamin D-Stoffwechsels, Veränderungen des Knochenturnover, der Mineralisation, des Volumens, des linearen Knochenwachstums und der Beanspruchbarkeit“ (Moe et al. 2006).

Die Knochenbiopsie ist aufgrund des invasiven Verfahrens und der zusätzlichen Kosten kein Routineverfahren zur Diagnostik der ROD. Sie ist jedoch bei folgenden klinischen Indikationen gerechtfertigt:

- Unstimmigkeiten der biochemischen Parameter, die eine definitive Interpretation unmöglich machen,
- ungeklärte Frakturen oder Knochenschmerzen,
- schwere fortschreitende Gefäßverkalkungen, unerklärbare Hyperkalzämie,
- Verdacht auf Aluminiumüberladung oder -toxizität (oder anderer Metalle), vor Parathyreoidektomie so eine Aluminiumbelastung in der Vergangenheit stattgefunden hat oder die laborchemischen Marker nicht mit einem fortgeschrittenen sekundären oder tertiären Hyperparathyreoidismus übereinstimmen,
- vor dem Beginn einer Therapie von Bisphosphonaten (Coen et al. 1998, Hruska Teitelbaum 1995, Moe et al. 2006, Schumock Sprague 2007).

Die histomorphometrische Einteilung erfolgt nach der Internationalen Klassifikation der renalen Osteodystrophie (Hruska Teitelbaum 1995). Es werden fünf Gruppen unterschieden: Ostitis fibrosa, Osteomalazie, Gemischte Störungen, milde Störungen und die adynamie Knochenerkrankung.

Tabelle 2: Histologische Klassifikationen der renalen Osteodystrophie (nach Hruska Teitelbaum, NEJM, 1995)

Erkrankung	Beschreibung	Pathogenese
Ostitis fibrosa	Peritrabekuläre Fibrose, Erhöhtes Remodeling, Resorption und Formation	sek. Hyperparathyreoidismus, sekundäre Rolle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren
Osteomalazie	Vermehrte Bildung von Osteoid, defekte Mineralisation	Aluminiumablagerungen, unbekannte Faktoren
Gemischte Störungen	Zeichen sowohl der Ostitis fibrosa als auch der Osteomalazie	sek. Hyperparathyreoidismus, Aluminiumablagerungen, unbekannte Faktoren
Milde Störung	Gering gesteigertes Remodeling	Beginnender oder behandelter Hyperparathyreoidismus
Adyname Knochenerkrankung	Hypozelluläre Knochenoberfläche, kein Remodeling	Aluminiumablagerungen, PTH-Suppression, andere Faktoren

Die häufigste Form der renalen Osteodystrophie im Stadium 3 und 4 der chronischen Niereninsuffizienz stellt die high turnover Erkrankung der Ostitis fibrosa, ausgelöst beispielsweise durch den sekundären Hyperparathyreoidismus, dar gefolgt von der gemischten Osteodystrophie (Elder 2002, Lehmann et al. 2008, Lund et al. 2006). Low turnover Erkrankungen machen in diesem Stadium nur etwa 10% aus. Im Stadium 5 repräsentieren low turnover Erkrankungen mit 60% den größeren Teil der renalen Osteopathie. Davon entfallen 20%-40% auf die adyname Knochenerkrankung und 4-12% auf die Osteomalazie (Joy et al. 2007). Von Lehmann et al konnten keine Zunahme der Prävalenz von low turnover Erkrankungen im Stadium 5 der CNI festgestellt werden (Lehmann et al. 2008).

Bei der Ostitis fibrosa kommt es zu einer erhöhten Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten. Histologisch zeigt sich eine peritrabekuläre Fibrose und ein gesteigertes Knochenremodeling.

Der Osteomalazie können ursächlich ein Calcitriolmangel und eine Aluminiumintoxikation z.B. durch aluminiumhaltige Medikamente zugrunde liegen. Histologisch zeigt sich eine Abnahme von Osteoblasten und Osteoklasten, außerdem kommt es zu einer Zunahme von unmineralisiertem Osteoid.

Die genaue Ursache der adynamen Knochenerkrankung ist ungeklärt. Diskutiert werden eine zu starke PTH-Suppression mit Vitamin D Präparaten und eine Aluminiumüberladung.

Histologisch zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Osteomalazie - es fehlt jedoch die Zunahme des unmineralisierten Osteoids (Ferreira 2006, Martin González 2007). Insbesondere bei der Peritonealdialyse scheint diese Form eine Rolle zu spielen (Torres et al. 1995). Sowohl höheres Alter als auch Diabetes begünstigen die Entwicklung der adynamen Knochenerkrankung (Couttenye et al. 1999, Sherrard et al. 1993). Insgesamt kommt es zu einem deutlich erhöhten Frakturrisiko. Es wurde eine 3-4 fache Erhöhung des Hüftfrakturrisikos bei Dialysepatienten gegenüber der Normalpopulation nachgewiesen (Lund et al. 2006). Das Frakturrisiko steigt mit der Dialysedauer (Ureña et al. 2003).

Die milde Störung zeigt ein gering gesteigertes Remodeling, ursächlich spielt hier ein beginnender oder bereits behandelter Hyperparathyreoidismus eine Rolle.

2.4.1 Diagnostik der ROD und leitliniengerechte Therapie der chronischen Niereninsuffizienz entsprechend der KDIGO-Guidelines (2006)

2.4.1.a Kontrollabstände der Laborwerte und Therapie der Stoffwechselentgleisungen

- CNI Stadium 3 und 4

Die Serumsiegel von Phosphor, Kalzium und iPTH sollten bei allen Patienten ab Stadium 3 der chronischen Niereninsuffizienz (GFR <60 ml/min) entsprechend den KDIGO- und K/DOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) -Leitlinien in regelmäßigen Abständen kontrolliert werden (siehe Tabelle 3 und 4).

Bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung Stadium 3 und 4 sollte der Serum-Phosphat Spiegel im Bereich von 2,7 mg/dl (0,87 mmol/l) bis 4,6 mg/dl (1,49 mmol/l) liegen. Das Serum-Kalzium-Phosphatprodukt sollte unter $55 \text{ mg}^2/\text{dl}^2$ ($4,5 \text{ mmol}^2/\text{l}^2$) liegen, da es sonst zu Gefäß- und Bindegewebsverkalkungen kommen kann, die die Mortalität der Dialysepatienten erhöhen (Malluche et al. 2004, Slatopolsky et al. 2003).

CNI Stadium	GFR (ml/Min/1,73m²)	Bestimmung von iPTH	Bestimmung von Kalzium/Phosphat
3	30-59	jährlich	jährlich
4	15-29	vierteljährlich	vierteljährlich
5	<15 oder Dialyse	vierteljährlich	monatlich

Sollten die iPTH Spiegel bei mehr als 2 aufeinanderfolgenden Messungen für Stadium 3 über 70 pg/ml (7,7 pmol/l) für Stadium 4 über 110 pg/ml (12,1 pmol/l) liegen, muss die Phosphatzufuhr eingeschränkt werden. Sollte dies nicht zu einer Senkung des iPTH-Spiegels führen, müssen Calcitriol (oder Analoga) sowie Doxercalciferol eingesetzt werden.

Der Serumkalziumspiegel muss im Normbereich gehalten werden; die Gesamtzufuhr für Kalzium soll weniger als 2000mg/d betragen.

Bei Hypokalzämie werden Kalziumsalze (z.B. Kalziumcarbonat) sowie orale Vitamin-D-Sterole verabreicht.

Bei iPTH-Plasmaspiegel oberhalb des Zielbereichs ist die Bestimmung des 25-Hydroxyvitamin-D im Serum notwendig. Liegt das 25-Hydroxyvitamin-D im Normalbereich ist eine jährliche Kontrolle ausreichend.

Eine Hyperphosphatämie sollte zuerst dietätisch behandelt werden. Wird der Normbereich nicht erreicht, stehen kalziumhaltige und kalziumfreie Phosphatbinder zur Wahl (Weinreich 1998, González Martin 2001).

- Therapie der CNI Stadium 5

Im Stadium 5 der Niereninsuffizienz liegen die Kontrollabstände für iPTH bei 3 Monaten und für Kalzium und Phosphat bei einem Monat. Bei Hämo- und Peritonealdialysepatienten sollten die Zielbereiche der Serum-Phosphatspiegel zwischen 3,5 und 5,5 mg/dl (1,13 bis 1,78 mmol/l), der iPTH-Plasmaspiegel 150-300pg/ml (16,5-33,0 pmol/l) und der Serumspiegel für korrigiertes Gesamtkalzium 8,4 bis 9,5 mg/dl (2,10 bis 2,37 mmol/l) nicht über- oder unterschritten werden. Es stehen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

Die Ziele der Therapie sind auch im Stadium 5 die Senkung des Phosphatspiegels, Steigerung der 25-Hydroxycholecalciferol- und 1,25 Dihydroxycholecalciferol-Spiegel.

Tabelle 4: Bestimmungshäufigkeit von iPTH, Kalzium und Phosphat im Stadium 5 der CKD
Entsprechend der K/DOQI Guidelines 2006

GFR (ml/Min/1,73m²)	Bestimmung von iPTH	Bestimmung von Kalzium/Phosphat
<15 oder Dialyse	vierteljährlich	monatlich

In der Therapie der symptomatischen Hypokalzämie können Kalziumsalze wie Kalziumcarbonat und/oder orale Vitamin-D-Sterole eingesetzt werden.

Aktive Vitamin-D-Sterole sollten bei hohen iPTH-Plasmaspiegeln $>33\text{mmol/l}$ ($> 300\text{ pg/ml}$) eingesetzt werden, um Veränderungen am Knochen zu verhindern bzw. zu beseitigen (Hruska et al. 2007, Martin González 2007, Spasovski 2007).

Eine chirurgische Parathyreoidektomie sollte in Betracht gezogen werden, wenn die Plasmaspiegel von iPTH fünf- bis siebenfach über dem Normalbereich liegen und zugleich eine Hyperkalzämie $> 9,5\text{mg/dl}$ ($>2,60\text{mmol/l}$) und/oder eine Hyperphosphatämie $>5,5\text{mg/dl}$ ($>1,78\text{ mmol/l}$) besteht. Auch metastatische Kalzifikationen und radiologische Auffälligkeiten tragen zur Entscheidung über eine Parathyreoidektomie bei (Joy et al. 2007, Malluche Faugere 1990, Slatopolsky et al. 2003).

Dialysepatienten können Aluminium nicht mehr ausscheiden. Das Entstehen einer Osteomalazie bei Dialysepatienten durch Aluminiumüberladung soll durch geringe Aluminiumkonzentrationen ($<10\text{ }\mu\text{g/l}$) im Dialysat und das Vermeiden der Gabe von aluminiumhaltigen Phosphatsenkern verhindert werden. Im Falle einer Aluminiumüberladung ist eine Therapie mit Desferrioxamin erforderlich (Locatelli et al. 2002).

Tabelle 5: Zielwerte der K/DOQI-Guidelines (2006) für den Knochenstoffwechsel bei CNI

	iPTH	Phosphat	Kalzium	Kalzium- Phosphat- Produkt
Stadium 3	35-70 pg/ml	2,7 mg/dl (0,87 mmol/l)-4,6 mg/dl (1,49 mmol/l)	8,4-9,5 mg/dl 2,1-2,37 mmol/l	Innerhalb Normbereich halten
	3,85-7,7 pmol/l			
Stadium 4	70-110 pg/ml			
	7,7-12,1 pmol/l			
Stadium 5	150- 300 pg/ml	3,5-5,5 mg/dl		<55 mg ² /dl ²
	16,5-33 pmol/l	1,1-1,8 mmol/l		<4,5 mmol ² /l ²

Bei der Behandlung der einzelnen Formen der renalen Osteopathie sind also Unterschiede zu beachten.

Bei dem sekundären Hyperparathyreoidismus spielt die Regulierung von Phosphor, Kalzium und iPTH die größte Rolle. Ein frühzeitiges Erkennen des sekundären Hyperparathyreoidismus ist entscheidend für eine effektive Therapie (Andress et al. 2008, Elder 2002).

Sollte eine Osteomalazie aufgrund eines Vitamin D₂- (Ergocalciferol) oder -D₃-Mangels (Cholecalciferol) bestehen, ist diese durch eine Vitamin D₂- oder -D₃-Gabe auszugleichen. Sollte diese Therapie nicht ansprechen ist auf aktive Vitamin D Sterole zurückzugreifen (Joy et al. 2007).

Bei einer adynamen Knochenerkrankung liegt der Schwerpunkt der Therapie auf einer Steigerung des Knochenremodelings. Daher ist es notwendig, eine Erhöhung des iPTH-Serumspiegels zu erreichen. Phosphatbindertherapie und Vitamin D Therapie sollten angepasst, eventuell sogar beendet werden. Auch eine Absenkung der Kalziumkonzentration im Dialysat kann zur Normalisierung der Serumkalziumwerte und Verringerung von hyperkalzämischen Episoden und damit zu einem Anstieg des PTH-Spiegels und zu einer Normalisierung des Knochenstoffwechsels beitragen (Haris et al. 2006, Hruska 1998, Spasovski 2007, Weinreich 1998).

2.4.1.b Radiologie

Röntgenaufnahmen des Knochens sind zur Untersuchung der renalen Osteopathie nicht indiziert. Sie sind allerdings nützlich zur Diagnostik von ausgeprägten peripheren Gefäßverkalkungen und Osteopathie infolge β_2 -Mikroglobulin-Amyloidose.

Die Knochendichte sollte bei Patienten mit Frakturen und bekannten Risikofaktoren für eine Osteoporose mittels DEXA (Dual Energy X-Ray Absorptiometrie) gemessen werden. Der Stellenwert der DEXA bei der renalen Osteodystrophie ist noch unklar. Empfehlungen sind daher nicht möglich.

2.4.1.c Histologie

Die exakteste Methode zur Unterscheidung der renalen Osteodystrophieformen ist die Beckenkammbiopsie mit vorheriger Tetracyclinmarkierung und histomorphometrischer Auswertung (Coen et al. 1998, Ferreira Drücke 2000, González Martin 2001, Hruska Teitelbaum 1995, Krpan 2001, Lehmann et al. 2008, Malluche et al. 1999, Malluche Faugere 1990, Slatopolsky et al. 2003, Schumock Sprague 2007).

Sie wird im klinischen Alltag bei Patienten mit Niereninsuffizienz Stadium 5 und folgenden Symptomen empfohlen:

- pathologische Frakturen,
- iPTH-Plasmaspiegel zwischen 100 und 500 pg/ml (11,0 bis 55,0 pmol/l) einhergehend mit unklarer Hyperkalzämie,
- starke Knochenschmerzen oder unklarer Anstieg der alkalischen Knochenphosphatase,
- Verdacht auf aluminiumassoziierte Osteodystrophie (Bailie et al. 2006, Sprague 2000).

Serum- und Urinspiegel von im Knochenstoffwechsel freiwerdenden Proteinen, wie Pyridinolon-Crosslinks, sowie dass von Osteoklasten freigesetzte Enzym TRAP und Osteocalcin werden bei metabolischen Osteodystrophien als Knochenstoffwechselmarker eingesetzt (Ferreira 1998).

2.5 Advanced Glycation Endproducts

2.5.1 Definition, Entstehung, Vorkommen

Advanced Glycation Endproducts (AGEs) sind Produkte die bei der nicht-enzymatischen Glykosilierung entstehen. Sie finden sich besonders in Geweben, die bevorzugt oxidativem Streß durch Fruktose oder Glukose ausgesetzt sind.

Sie stellen eine heterogene Gruppe von Molekülen, die sich durch eine Braunfärbung, Fluoreszenz und Polymerisierung auszeichnen.

Maillard beschrieb 1918 die nicht-enzymatische Bräunungsreaktion. Unter Einwirkung von großer Hitze (150-180°C) entstehen in Anwesenheit von reduzierenden Zuckern und Aminosäuren in komplexen Reaktionen Bräunungsreaktionen von Lebensmitteln.

Auch im Körper kann D-Glukose unter physiologischen Bedingungen mit Aminosäuren eine Maillard Reaktion eingehen, z.B. proteingebundene Amadoriprodukte des Hämoglobin (Schleicher et al. 1991). AGEs kumulieren in langlebigen Proteinen (z.B. Kollagen)(Frye et al. 1998).

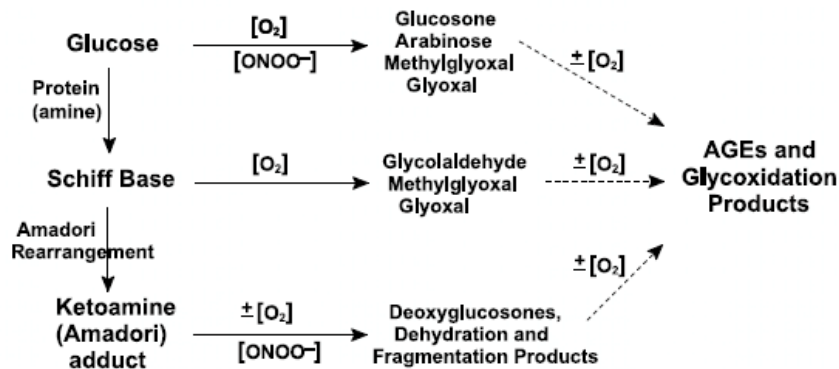


Abbildung 3: Alternative Wege der Maillard Reaktion von Glukose. Die Bildung von AGEs wird durch die Oxidation und Fragmentierung von Zucker oder seinen Addukten an Proteine katalysiert. Diese Reaktionen werden durch ROS (reactive oxygen species) und Peroxynitrite katalysiert (Thorpe Baynes 2003).

Unabhängig von pathologischen Erscheinungen kumulieren sie im Körper mit dem Alter (Thorpe Baynes 2003).

Nach Endozytose werden AGEs degradiert. Es entstehen AGEs mit einem niedrigen Molekulargewicht, welche reaktive Zwischenprodukte darstellen. Die Toxizität der Substanzen wird durch die renale Ausscheidung limitiert (Vlassara Palace 2003).

Bevorzugt werden sie über die Nieren ausgeschieden; zuerst wurden sie bei Patienten mit einem Diabetes mellitus und diabetischer Nephropathie nachgewiesen. Gewebe (z.B. Gefäße, Augen und Nieren), die einem erhöhten Blutglukosespiegel ausgesetzt sind, neigten zu vermehrten Alterungsprozessen (Schleicher et al. 1997, Vlassara Palace 2002). Aber auch bei Morbus Alzheimer, terminaler Niereninsuffizienz sowie Arteriosklerose spielen AGEs eine pathogenisierende Rolle (Schmidt et al. 1994, Smith et al. 1994).

2.5.2 Bedeutung

AGEs verursachen über verschiedene Mechanismen pathologische Veränderungen. AGEs verändern die Signalübertragungswege unter Einbeziehung von Liganden der extrazellulären Matrix. Das erste Matrixprotein, bei dem intramolekulare kovalente Bindungen durch AGEs festgestellt wurden, war das Kollagen (Kent et al. 1985).

Des Weiteren modifizieren AGEs Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone.

Sie setzen außerdem mit AGE spezifischen Rezeptoren oder Bindungsproteinen (AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, ScR-II, CD36 und RAGE) Radikale frei. Der bedeutendste dieser Faktoren ist der sog. Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE). RAGE ist ein Signaltransduktions-Rezeptor für AGEs aus der Immunglobulinsuperfamilie welcher verschiedene zelluläre Abläufe vermittelt. Beispielsweise bewirkt er Veränderungen der Permeabilität, des Wachstums und der Thrombogenität. Auch wird vermutet, daß RAGE eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von renalen Schäden, beispielsweise bei Diabetes mellitus Typ 1, aber auch bei nicht mit Diabetes assoziierten Nierenerkrankungen, spielt (Abel et al. 1995, Esposito et al. 1989, Jensen et al. 2006, Schmidt et al. 1994, Valencia et al. 2004, Yonekura et al. 2003). Dabei sind sowohl lösliche sRAGE als auch RAGE auf der Zelloberfläche nachgewiesen worden (Schmidt et al. 1994). Durch eine Aktivierung von RAGE kann es über zelluläre Signalwege zur einer Aktivierung von NF- κ B kommen welches zu einer Transkription von proinflammatorischen Zytokinen führt (Neeper et al. 1992). Die Expression von RAGE wird durch AGEs gesteigert. Es wurde nachgewiesen, dass AGEs die Produktion von IL 6 steigern, welches an der Stimulierung der Knochenresorption beteiligt ist (Neeper et al. 1992, Takagi et al. 1997, Wendt et al. 2003).

Proteinmodifikationen durch AGEs (CML) mit RAGE steigern die Signalwege zur Produktion von NF- κ B und die Genexpression (Kislinger et al. 1999).

Monozyten und Makrophagen waren die ersten Zellen, bei denen ein spezieller AGE-Rezeptor nachgewiesen wurde. Rezeptoren wurden auch an glomerulären mesangialen Zellen,

Hepatozyten, glatten Muskelzellen und Gefäßendothelien nachgewiesen (Brownlee 1995, Schmidt et al. 1993, Schmidt et al. 1994, Yonekura et al. 2003).

Letztlich können intrazelluläre AGE-Bildungen direkt Proteinfunktionen in Zielgeweben verändern (Brownlee 1995).

2.5.3 Entstehung von AGEs (CML/Imidazolone)

Eine Möglichkeit der Entstehung von AGE verläuft über die nichtenzymatische Reaktion (Maillard Reaktion) mit Glukose oder anderen reduzierenden Zuckern und N-terminalen Aminosäuren oder Aminogruppen von Proteinen. Zuerst entsteht eine sog. Schiff'sche Base welche in ein instabiles Amadoriprodukt umgewandelt wird, Eliminationen und Kondensationen führen letztlich zu irreversiblen Crosslinks (Ahmed et al. 1986, Kent et al. 1985).

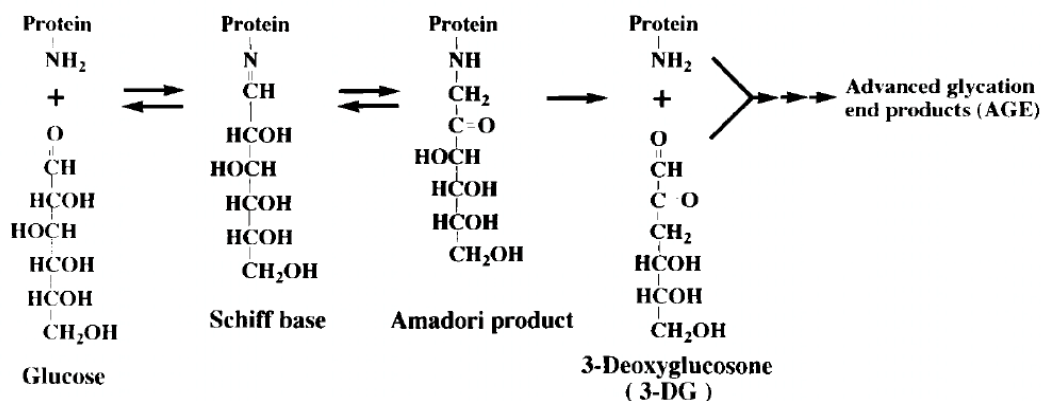


Abbildung 4: Nichtenzymatische Synthese von 3-DG und AGEs bei der Maillard Reaktion (Niwa et al. 1997).

Oxidation begleitend zur Glykierung unterstützt die Bildung von CML. CML entsteht durch Autooxidation von Glukose oder durch Metallionen-katalysierte oxidative Fragmentation sowie mittels Autooxidation durch Ascorbinsäure.

Auch die Myeloperoxidase, ein Enzym von Gewebsmakrophagen und neutrophilen Granulozyten, welches bei inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt, fördert die Bildung von CML (Anderson et al. 1999, Bierhaus et al. 1998).

Bei der Imidazolonebildung reagiert Glukose mit Proteinaminogruppen zu einer Schiff'schen Base, welche in ein Amadoriprodukt umgewandelt wird. Dieses unterläuft mehrfachen

Dehydratationen und Umlagerungen, woraus u.a. das hochreaktive 3-Deoxyglukosane entsteht. Dieses reagiert erneut mit N- α -benzoylarginin-Amid zu Imidazolone A und B. Im Gegensatz zu CML entsteht es nicht durch oxidative Vorgänge (Niwa et al. 1997).

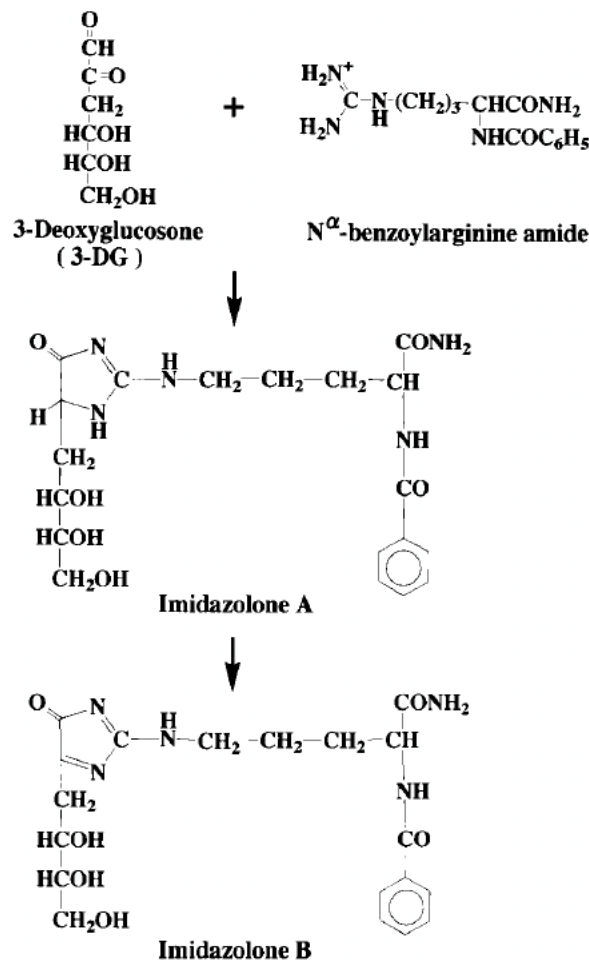


Abbildung 5: Entstehung von Imidazolone A und B durch in vitro Inkubation von 3-DG mit einem Arginin Derivat. (Niwa et al. 1997)

AGEs wurden in Hämoglobin, Linsencristallin, Beta-2-Mikroglobulin, Beta-Amyloid-Peptid und dem Tau-Protein nachgewiesen.

Sie sind mit Erkrankungen wie Diabetes mellitus, chronischer Niereninsuffizienz, Katarakt, Alterungsvorgängen von Geweben, M. Alzheimer u.a. assoziiert.

Es wird vermutet, dass Imidazolone das Fortschreiten der Langzeitkomplikationen (z.B. die Nephropathie) beim Diabetes vorantreibt und auch bei der Atherosklerose eine Rolle spielt. Dafür spricht, dass Imidazolone in den Tubuluszellen der Nieren, aber auch in der Intima und

Media von Arterien (Niwa et al. 1997) sowie in Augenlinsen (Frye et al. 1998) nachgewiesen wurde.

CML-Ablagerungen wurden in diversen Geweben, beispielweise in Augenlinsen, Haut und Kollagen nachgewiesen (Ahmed et al. 1997).

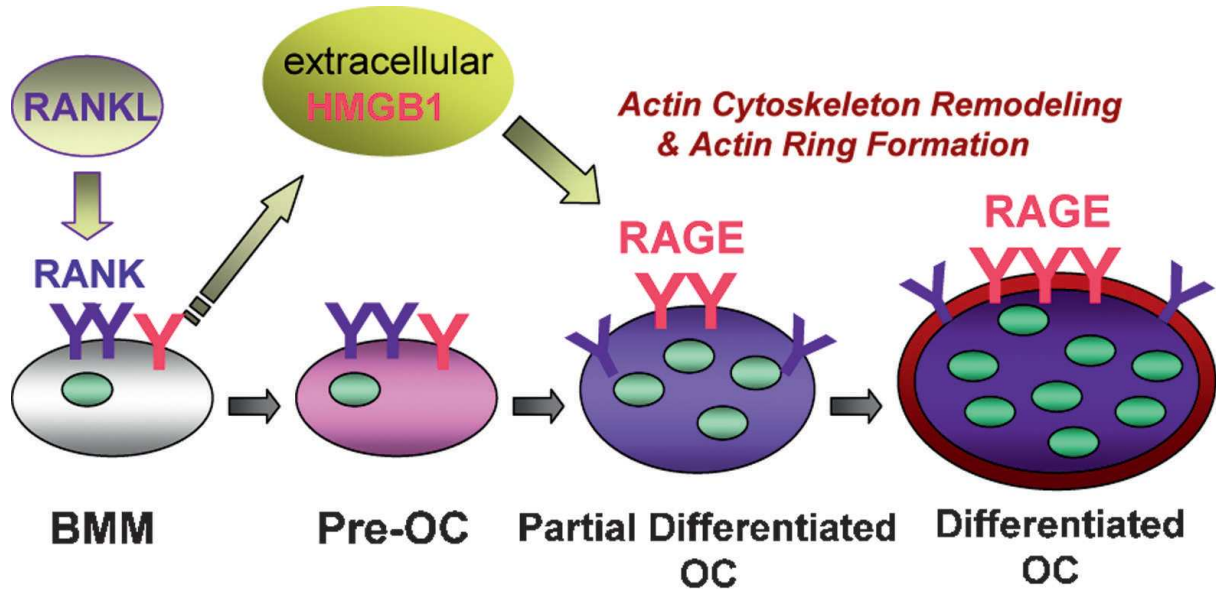


Abbildung 6: Arbeitshypothese über die HMGB1 Regulation der Osteoklastogenese (Zhou et al. 2008).

Von Zhou et al wird vermutet, daß es zu einer Regulation der Osteoklastogenese durch High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) über RAGE kommt. Dabei wird HMGB1 freigesetzt von BMMs (Bone Marrow Macrophages) in Abhängigkeit zur RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) Stimulation. Die extracelluläre HMGB1 reguliert, größtenteils über RAGE, das Remodeling, die Differenzierung und die Funktion des osteoklastischen Aktin Zytoskeletts (Zhou et al. 2008).

Über Ablagerungen von AGEs im Knochen liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor (Hein 2006, Franke et al. 2007, Valcourt et al. 2007, Weiss 2006).

Von Weiss (Weiss 2006) wurden erstmals Ablagerungen von CML und Imdidazon im Knochen von Patienten mit Osteoporose und renaler Osteodystrophie nachgewiesen. Daraus wurde eine AGE-Beteiligung an der Pathogenese dieser Krankheitsbilder durch ein gestörtes Knochenremodeling über AGE Modifizierungen ossärer Proteine abgeleitet.

3. Fragestellung

1. Lassen sich Advanced Glycation Endproducts (N ϵ -Carboxymethyllysin (CML) und Imidazolon) bei Patienten mit ROD im Knochenschnitt nachweisen?
2. Bestehen Unterschiede im Ablagerungsmuster zwischen den verschiedenen ROD-Formen?
3. Lassen sich Zusammenhänge zwischen dem AGE-Nachweis am Knochenschnitt mit anamnestischen, demographischen, laborchemischen und knochenhistologischen Parametern aufzeigen?

4. Material und Methoden

4.1 Patienten

Es wurden insgesamt 30 Knochenbiopsien von Patienten mit einer renalen Osteodystrophie (17 Männer und 13 Frauen) untersucht. Eine Biopsie konnte nicht ausgewertet werden da die immunhistochemische Färbung fehlschlug. Das Alter zum Zeitpunkt der Knochenbiopsie schwankte bei den 17 Männern zwischen 26-65 Jahren und bei den Frauen zwischen 25-68 Jahren.

Tabelle 6: Altersverteilung bei den histomorphometrischen Diagnosen

Renale Osteodystrophie, histomorphometrische Gruppe	Anzahl untersuchter Biopsien		Alter (Mittelwert (Standardabweichung))	
	m	w	m	w
Hyperparathyreoidismus	9	11	50,3(12,2)	49,6(14,2)
Adynome Form	7	2	51,1(14,2)	65,5(3,5)

Legende: m=männlich, w=weiblich

Die Beckenkammbiopsien wurden in den Jahren 2003, 2004 oder 2005 entnommen; sie erfolgten zur Therapiefestlegung nach Beginn der Dialyse sowie vor geplanter Nierentransplantation.

Die Klassifikation nach histologischen Subtypen (Hruska Teitelbaum 1995) der renalen Osteopathie erfolgte nach histomorphometrischen Kriterien. Die histomorphometrische Einteilung wurde entsprechend der American Society of Bone and Mineral Research Nomenklatur (Tabelle 2) durchgeführt.

Renale Grunderkrankungen waren: diabetische Nephropathie (5 Patienten), Glomerulonephritis (6 Patienten), Zystennieren (3 Patienten), je 2 Patienten mit Pyelonephritis, Nierentransplantatversagen, benigner Nephrosklerose, Glomerulosklerose, je 1 Patient mit Schwangerschaftsgestose, Hydronephrose, Arterio-/Arteriolsklerose, Refluxnephropathie, nephrotischen Syndrom, Schrumpfniere sowie unklarer Genese der renalen Erkrankung.

19 Patienten wurden mittels Hämodialyse, 3 mittels Peritonealdialyse behandelt, bei 12 Patienten war eine Nierentransplantation erfolgt (davon 2 Patienten mit Transplantatversagen und 2 mit Transplantatabstoßung, bei einem Patienten fand ein Dialysewechsel statt).

Tabelle 7: Patientendaten beider Gruppen der renalen Osteodystrophie.

Pat. Nummer	Sex	Alter	Diagnose	Diabetes	NTX	PTX	Typ der Dialyse	Dialyse-dauer (Monate)	internationale Klassifikation der renalen Osteopathie
8868	m	60	TNI	ja	-	-	HD	33	Typ I
8873	m	43	TNI	-	-	-	HD	42	Typ I
8876	w	59	TNI	ja	-	-	HD	43	Typ I
8899	w	65	TNI	-	03/97	-	HD	90	Typ I
8901	m	37	TNI	-	04/03	-	HD	84	Typ I
8931	w	25	CNI	-	-	-	ja	2	Typ I
8951	m	46	CNI	-	-	-	keine	0	Typ I
9083	m	54	TNI	ja	06/99	-	HD	27	Typ I
8865	w	65	TNI	-	-	-	PD	99	Typ I
8866	w	48	TNI	-	-	-	HD	54	Typ I
8906	m	60	TNI	ja	-	-	HD	24	Typ I
8916	m	51	TNI	ja	05/03	-	HD	86	Typ I
8917	m	26	TNI	-	05/03	-	HD	68	Typ I
8922	w	49	TNI	-	-	-	HD	61	Typ I
9025	w	40	CNI	-	01/04	06/03	keine	0	Typ I
8869	w	61	TNI	-	-	-	PD	41	Typ I
8894	w	62	CNI	-	-	-	keine	-	Typ I
8958	w	29	TNI	-	09/03	-	PD	-	Typ I
9056	m	63	TNI	ja	-	-	HD	2	Typ I
9091	w	42	TNI	-	01/91, 06/04	-	HD	30	Typ I
9098	m	56	TNI	-	05/98, 06/04	-	HD	123	Typ I
8896	w	63	TNI	-	-	99/ 2002	HD	73	Typ IV
8947	m	54	CNI	-	12/94,08 /03	-	HD	-	Typ IV
8961	m	59	CNI	-	-	-	Keine	0	Typ IV
9004	m	30	TNI	-	-	-	Ja	54	Typ IV
9028	m	65	pTNI	-	-	-	Keine	0	Typ IV
9068	m	53	TNI	ja	-	-	HD	1	Typ IV
9069	m	33	TNI	-	04/04	02/03	HD	40	Typ IV
9116	w	68	pTNI	-	-	-	Unklar	-	Typ IV
9179	m	64	TNI	ja	04/05	-	HD ab 7/03, vorher PD	52	Typ IV

Legende: TNI= terminale Niereninsuffizienz, CNI= chronische Niereninsuffizienz, pTNI= präterminale Niereninsuffizienz; Typ I= Osteitis fibrosa; Typ IV= Adynamie Form, NTX= Nierentransplantation, PTX= Parathyreoidektomie, m= männlich, w=weiblich

Die Dialysedauer vor Knochenbiopsie betrug durchschnittlich 64,1 Monate (Männer 2-123 Monate, Frauen 30-99 Monate). 24 Patienten wurden mit Vitamin D und 11 mit Phosphatbindern behandelt. Eine Parathyreoidektomie war bei 3 Patienten vorgenommen worden.

4.2 Knochenbiopsie, Herstellung der Knochenschnitte, Histomorphometrie

Die Knochenentnahme erfolgte unter Lokalanästhesie aus der Crista iliaca anterior superior unter Benutzung der elektrischen one-step Bohrtechnik (Staumann Fräse) oder aus der Crista iliaca posterior unter Benutzung der handgesteuerten Jamshidi Nadel .

Die Knochenzylinder wurden in Aceton fixiert und in Methylmetacrylat kalt eingebettet. Die Temperatur im Blöckchen betrug 22°C statt 60° C mit dem Standardmethylacrylatverfahren, um immunhistochemische Untersuchungen zu ermöglichen (Hein et al. 2006).

Zur Kalteinbettung wurde das Technovit® 9100 Neu-System (Fa. Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Wehrheim, Deutschland) verwendet.

Am Hartschnittmikrotom (Polycut S Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland) wurden 4µm dicke Knochenschnitte hergestellt, die auf mit Ponallösung (2 Teile Ponallösung (1g Ponal auf 50ml aqua dest) und 1Teil Poly-Lysine Lösung (3ml Poly-L-Lysine auf 30ml a.d.)) beschichtete Objektträger (SuperFrost/Plus-Objektträger) gezogen wurden. Die Knochenschnitte wurden über Nacht unter Druck in einer Schraubzwinge bei ca. 60°C getrocknet.

Alle Schnitte wurden routinemäßig histomorphometrisch beurteilt und ausgewertet.

Folgende Parameter wurden entsprechend den Empfehlungen von Parfitt et al. 1987 ermittelt:

- BV/TV (bone volume/total volume) prozentualer Anteil des Knochenvolumens an der Endostoberfläche (in %)
- OV/BV (osteoid volume/ bone volume) Osteoidvolumen der Endostoberfläche (in %)
- OS/BS (osteoid surface/bone surface) Osteoidanteil der Endostoberfläche (in %)
- ObS/BS (osteoblast surface/ bone surface) Anteil der osteoblastenbesetzten Oberfläche der Endostoberfläche (in %)
- Oth Osteoidsaumbreite (in µm)
- ES/BS (eroded surface/bone surface) Anteil der Resorptionsoberfläche der Endostoberfläche (in %)
- OcS/BS (osteoclast surface/ bone surface) Anteil der mit Osteoklasten besetzten Oberfläche an der Endostoberfläche (in %)

- MS/BS (mineralizing surface/ bone surface) Anteil der mineralisierenden Oberfläche an der Gesamtoberfläche (in %)
- MAR (mineral apposition rate) Abstand zweier Tetrazyklinmarkierungen ($\mu\text{m/d}$)

Zur Klassifikation der histologischen Subtypen und Diagnoseeinteilung siehe Abschnitt 4.1 Patienten.

4.3 Immunhistochemie zum Nachweis von CML und Imidazolon

1.Tag:

Die Knochenschnitte wurden im ersten Arbeitsschritt 4 mal 15 min in 2-Methoxy-ethyl-acetat entplastet. Im Anschluß erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe je 2min ($2 \times 96\%$, $1 \times 80\%$, $1 \times 70\%$). Darauffolgend wurden die Schnitte in 3% Essigsäure (3min) entkalkt.

Die Deaktivierung der 3% Essigsäure erfolgte mit endogener Peroxidase mit $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Die Schnitte wurden nach jedem Arbeitsschritt mit einem Waschpuffer (PBS) gespült. Im Anschluß wurden die Schnitte mit einem hydrophoben Stift umrandet (DAKO-Pen, Dako A/S, Glostrup, Dänemark). Dies sollte gewährleisten dass die Schnitte während des gesamten Vorganges mit ausreichend Reagenz bedeckt waren. Nun erfolgte die Inkubation der Schnitte mit Normalserum für 10 Minuten. Das Serum wurde anschließend abgekippt und mit dem unkonjugierten Primärantikörper (polyklonaler rabbit-anti-CML-Antikörper (IgG), Roche Diagnostics GmbH, Deutschland; 1:150000 verdünnt; monoklonaler mouse-anti-Imidazolon-Antikörper (IgG) Dr. Niwa, T., Nagoya Universität, Nagoya, Japan; Verdünnung 1:10000) über Nacht bei 4° inkubiert. Alle sonstigen Schritte des 1. und 2. Tages erfolgten bei Raumtemperatur.

2.Tag:

Es folgte nun die Inkubation der Schnitte mit Avidin und Biotin für je 15 min, danach mit dem Sekundärantikörper und der ABC-Reagenz (Vectastain^R ABC Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) für anti-CML und anti-Imidazolon) für 30 min und der AEC- (Aminoethylcarbazol) Lösung für 10 min; im Anschluss wurden sie mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

Die Lagerung der Schnitte zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte in einer feuchten Kammer, um eine Austrocknung zu vermeiden.

4.4 Digitalisierung und Densitometrie

Nach lichtmikroskopischer Beurteilung (100-, 200-, 400-fache Vergrößerung) der Präparate wurden digitale Bilder im Schwarz-Weiß-Modus aufgenommen (Mikroskop Axioplan mit Digitalkamera AxioCam HRc, Carl Zeiss Jena, 200-fache Vergrößerung). Die densitometrischen Messungen erfolgten im Messmodus des digitalen Bildverarbeitungsprogramms AxioVisionLE-Release 4.1 (Zeiss, Jena). Mit Hilfe dieses Programms war es möglich, knöcherne Strukturen zu markieren und den mittleren Grauwert dieser markierten Flächen als Maß der Färbeintensität zu berechnen. Dabei war die Fläche umso dunkler, je kleiner der Grauwert war.

Es wurde pro Patient eine Imidazolon- und eine CML-Anfärbung angefertigt und bewertet.

Um eine objektive Auswertung zu ermöglichen, wurde jedes Präparat mit 30 Aufnahmen meanderförmig erfasst. Die Aufnahmebedingungen wie Helligkeit und Vergrößerung wurden nicht verändert.

Die Anzahl von 30 Aufnahmen wurde aufgrund der Empfehlungen von Delling gewählt (Delling 1975). Dort wurde festgestellt, dass bei der Morphometrie unter gleichbleibender Vergrößerung bei 10 zu beurteilenden Feldern der prozentuale Fehler bei 27,3% liegt, bei 30 Feldern nur noch 3,5% beträgt. Eine weitere Verringerung des Fehlers ließ sich auch unter höherer Vergrößerung kaum noch erzielen (50 Felder- Fehler bei 1,6%) (Delling 1975).

Die Mittelwerte der pro Patient erzeugten 30 Grauwerte bildeten die Grundlage für die statistische Auswertung.

4.5 Statistik

Mit Hilfe des Statistikprogramm SPSS (SPSS inc., Chicago, IL, USA, Version 15) erfolgte die Analyse und Berechnung der statistischen Parameter. Als Testverfahren wurde die Bestimmung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und Spearman angewendet, um mögliche Zusammenhänge zwischen

1. AGE-Anfärbung und Spongiosa,
2. Zusammenhänge von AGE-Anfärbungsgrad und weiteren laborchemischen Daten, Dialysetypen, Diabetes mellitus sowie die Unterschiede zwischen den einzelnen ROD-Formen darzustellen. Als signifikant wurden die Ergebnisse bei einem $p < 0,05$ angenommen.

Der Pearson-Korrelationskoeffizient stellt lineare Zusammenhänge dar. Der Korrelationskoeffizient nach Spearman kann sowohl lineare als auch über-lineare (z. B. quadratisch) oder unter-lineare (z. B. logarithmisch) Zusammenhänge darstellen.

5. Ergebnisse

5.1 Färbeverhalten und Beispiele immunhistochemischer Färbungen

Renale Osteodystrophie

Die Anfärbungen mit Imidazolon und CML wiesen einige Unterschiede auf. CML lagert sich vor allem im Knochenmark ab, die Trabekel bleiben weitestgehend ungefärbt (siehe Abbildung 7 und 9).

Imidazolon wiederum lagert sich deutlich in den Trabekeln ab, während das Mark schwächer angefärbt wird (siehe Abbildung 8 und 10). Insgesamt zeigt die Imidazolonanfärbung deutlich niedrigere Grauwerte, was höheren Anfärbeintensitäten entspricht. Im Vergleich vom Hyperparathyreoidismus zur adynamen Form zeigte diese insgesamt deutlich höhere Anfärbeintensitäten.

Hyperparathyreoidismus CML und Imidazolon:

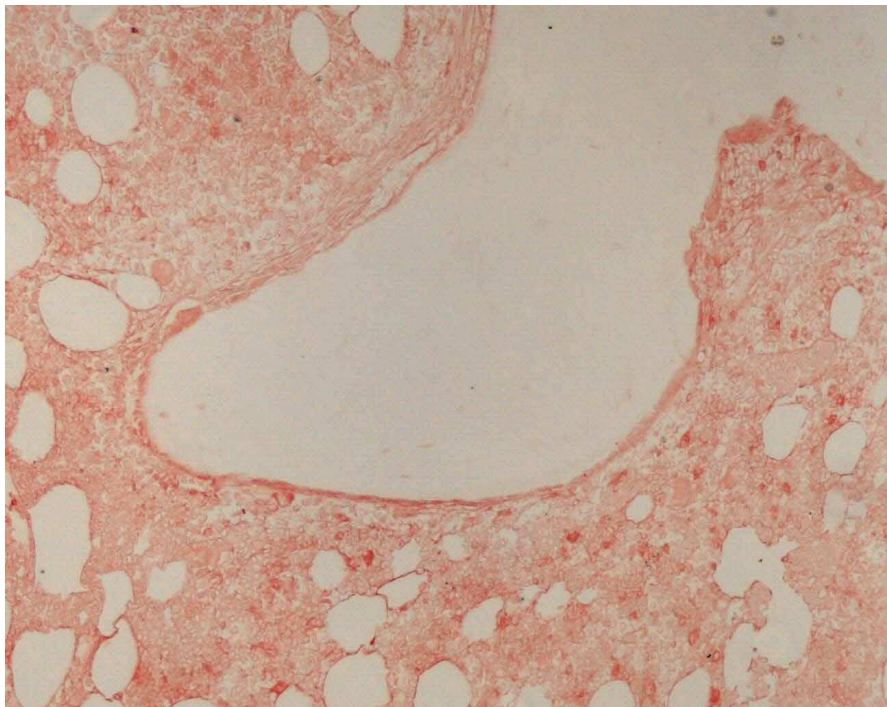


Abbildung 7: Pat. 8922, anti-CML 1:150000, 10x



Abbildung 8: Pat. 8906, anti-Imidazolon 1:10000, 10x

Adynome Form CML und Imidazolon:

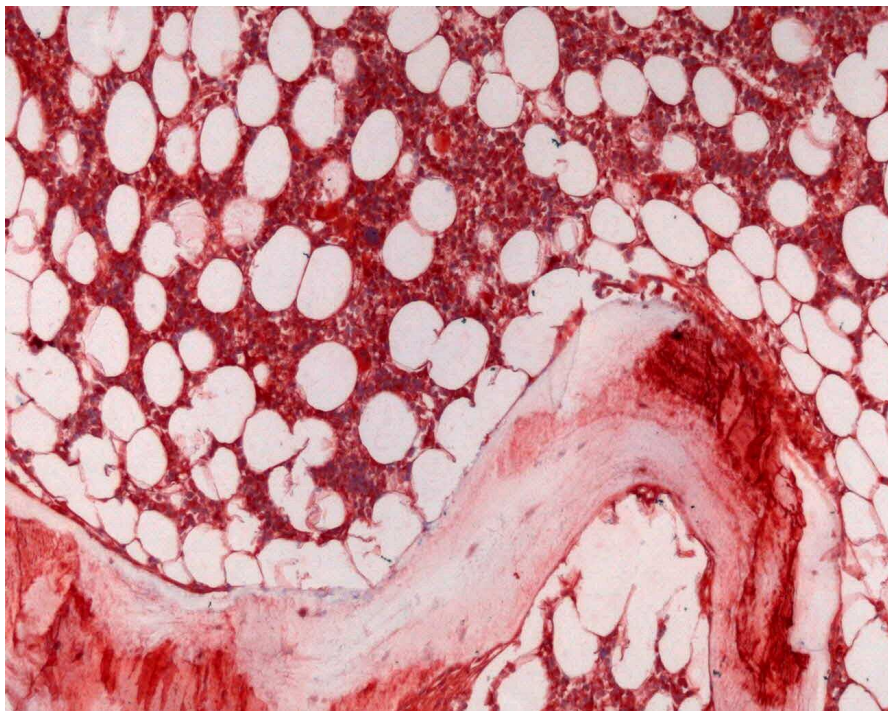


Abbildung 9: Pat. 9083: anti-Imidazolon 1:10000, 10x

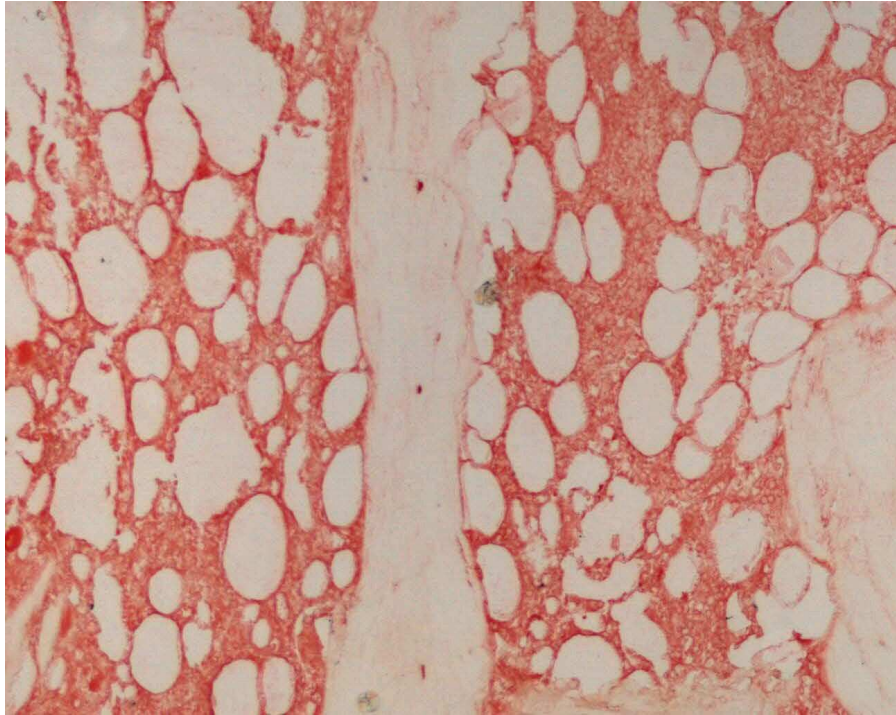


Abbildung 10: Pat. 9068: anti-CML 1:150000, 10x

5.2. Densitometrie

Mit Hilfe des digitalen Bildverarbeitungsprogramms AxioVisionLE-Release 4.1 (Zeiss, Jena) war es möglich, knöcherne Strukturen zu markieren und den mittleren Grauwert der markierten Flächen als Maß der Färbintensität zu berechnen.

Es wurden Knochenschnitte von 29 Patienten ausgewertet, jeweils mit CML- (1:150000) und Imidazolon-Anfärbungen(1:10000). Diese wurden im Schwarz-Weiß-Modus digitalisiert, um die Grauwerte der Flächen bei konstanter Helligkeit und Vergrößerung zu messen. Pro Präparat wurden meanderförmig 30 Aufnahmen angefertigt, dabei wurden sämtliche Knochenstrukturen markiert und im digitalen Bildverarbeitungsprogramm densitometrisch ausgewertet. Aus jedem Präparat wurden die mittleren Grauwerte pro Fläche berechnet, diese stellen die Anfärbungsintensität dar und bilden als gemittelte Grauwerte (Mittelwert aus 30 angefertigten Bildern pro Objektträger) die Grundlage für die statistische Auswertung. Bei einem Knochenschnitt (Pat. 8873) misslang die Färbung. Der Patient wurde daher nicht in die Auswertung einbezogen.

Im Folgenden sind Beispiele von Präparaten zweier Patienten mit Imidazolon- und CML-Anfärbung als Schwarz-Weissbilder zu sehen. Patient 8894 gehört zur Gruppe des Hyperparathyreoidismus. In der CML-Anfärbung hat die umrandete Fläche einen Grauwert

von $61280\mu\text{m}^2$, die Gesamtfläche entspricht $150290,3\mu\text{m}^2$. Die Gesamtfläche wurde jedoch nicht in die Auswertung mit einbezogen. In der Imidazolon-Anfärbung hat die Knochenfläche einen Wert von $13320,9\mu\text{m}^2$, die Gesamtfläche entspricht $150968,0\mu\text{m}^2$

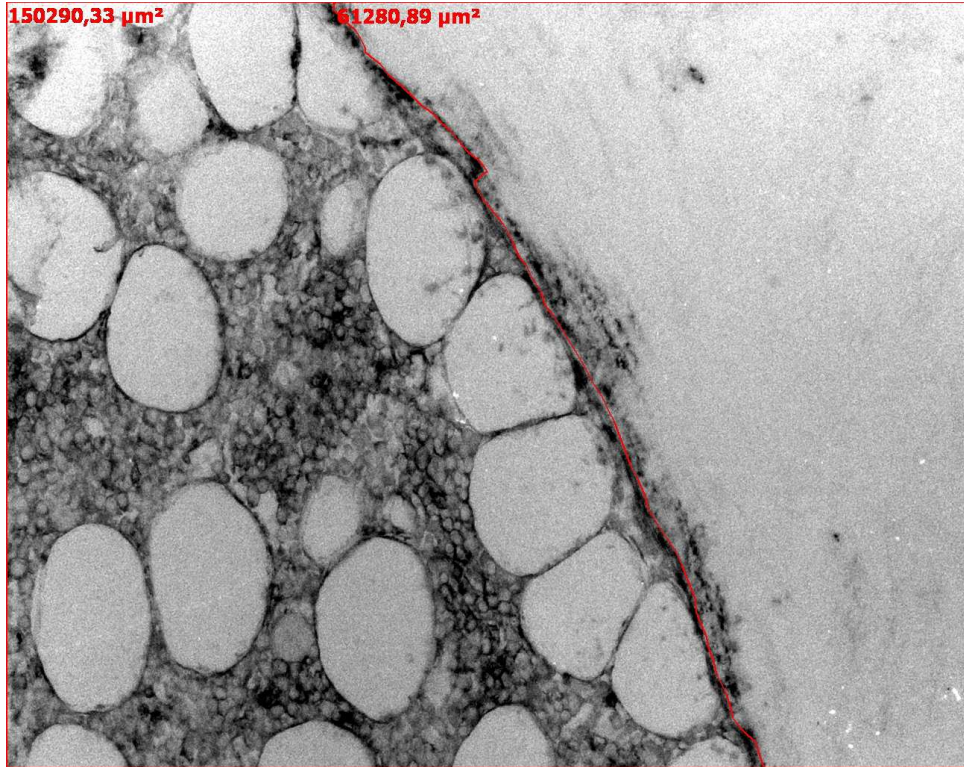


Abbildung 11: Hyperparathyreoidismus Pat. 8894 anti-CML, 1:150000; 200 x



Abbildung 12: Hyperparathyreoidismus Pat. 8894 anti-Imidazolon, 1:10000; 200x

Die histologischen Bilder der Abb. 13 und 14 zeigen eine adynome Form der Osteodystrophie bei Patient 8868; CML-Anfärbung (Gesamtfläche 149507,15µm²; Knochenfläche 29343,38µm²) und Imidazolon-Anfärbung (Gesamtfläche 149798,59µm²; Knochenfläche 128270,36µm²).

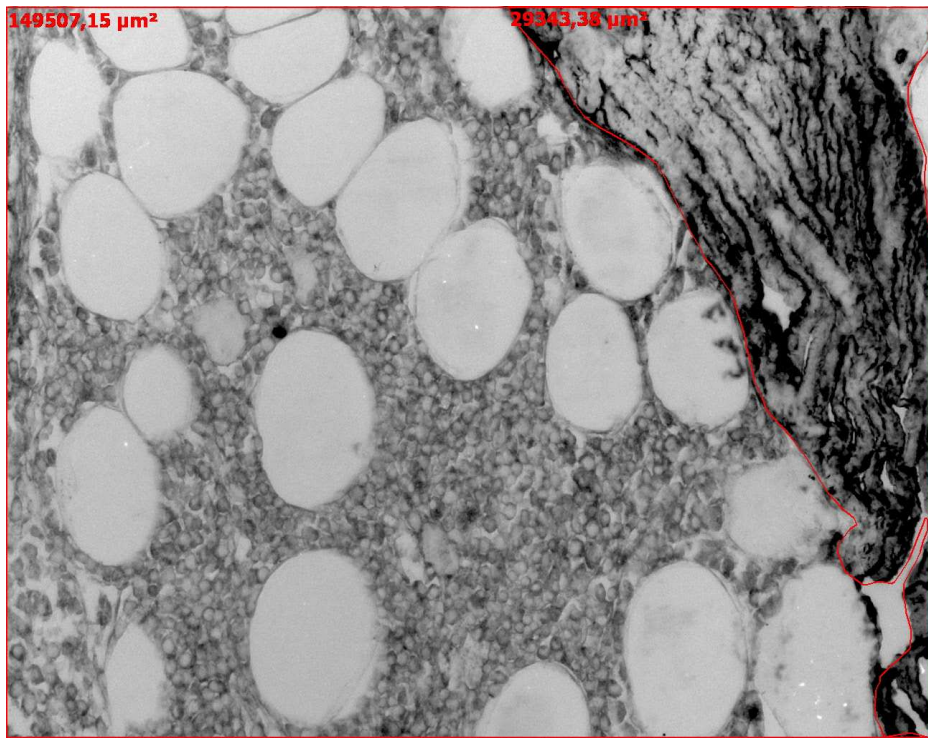


Abbildung 13: Adynome Form Pat.8868 anti-Imidazolone 1:10000, 200x

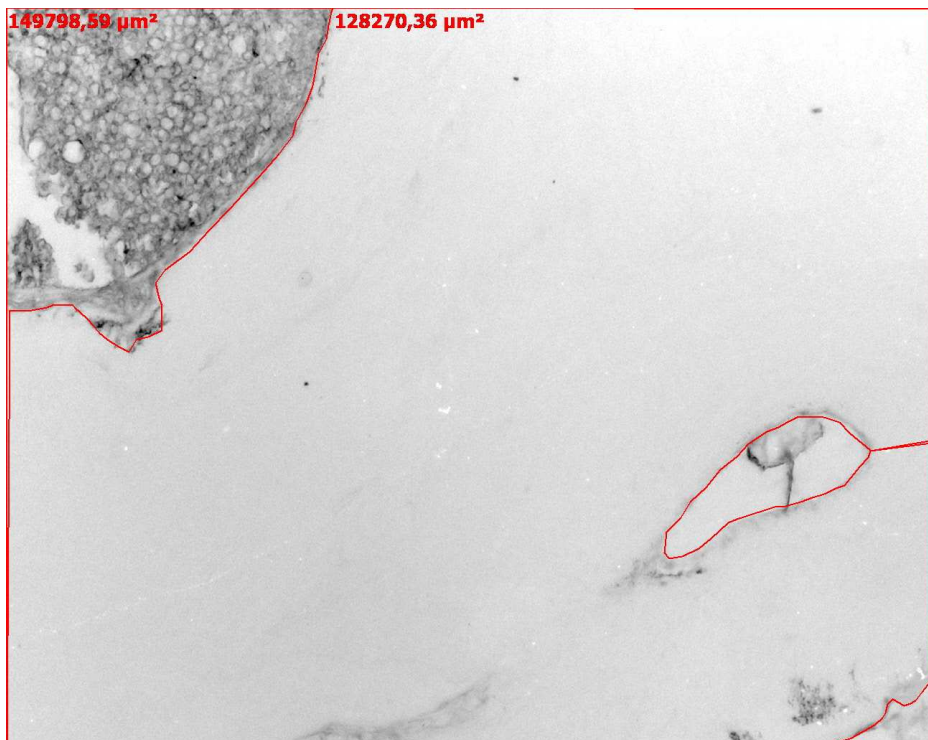


Abbildung 14: Adynome Form Pat 8868 anti-CML 1:150000; 200x

Die Tabellen 8 und 9 zeigen die Messwerte der 29 Patienten für CML und Imidazolone in Beziehung zur histomorphometrischen Diagnose.

Tabelle 8: Hyperparathyreoidismus Mittelwerte Graustufen CML-/Imidazolonfärbung (in μm^3)

Patientennummer	Mittelwert Graustufen nach Imidazolon Färbung	Mittelwert Imidazolon gerundet	Mittlere Standard-abweichung (gerundet)	Mittelwert Graustufen nach CML Färbung	Mittelwert CML gerundet	Mittlere Standard-abweichung (gerundet)
8868	2822,9	2823	535,8	8590,5	8591	622,7
8876	3351,3	3351	238,9	4497,6	4498	248,2
8899	3251,9	3252	543,6	4117,4	4117	290,5
8901	3190,5	3191	434,3	4083,4	4083	269,5
8931	2995,8	2996	581,4	5605,7	5606	341,6
8951	3054,1	3054	527,6	3479,2	3479	221,0
9083	988,3	988	98,3	3280,6	3281	200,8
8865	3917,9	3918	302,8	8612,8	8613	623,9
8866	3709,5	3710	399,6	9279,6	9280	663,5
8906	4152,1	4152	725,9	8879,1	8879	657,3
8916	2261,6	2262	263,4	3497,2	3497	206,6
8917	4848,9	4849	519,4	9303,8	9304	751,1
8922	1005,9	1006	66,5	4224,7	4225	244,1
9025	987,4	987	73,1	3234,4	3234	241,7
8869	1272,9	1273	424,8	3755,4	3755	182,5
8894	834,6	835	154,3	1029,9	1030	75,7
8958	1005,9	1006	238,2	3909,5	3910	285,4
9056	933,9	934	145,1	1909,1	1909	144,0
9091	1416,0	1416	207,6	3744,7	3745	309,5
9098	828,5	829	162,3	3825,8	3826	255,0

Tabelle 9: Adynome Form Mittelwerte Graustufen CML-/Imidazolonfärbung

Patientennummer	Mittelwert Graustufen nach Imidazolon Färbung	Mittelwert Imidazolon gerundet	Mittlere Standard-abweichung (gerundet)	Mittelwert Graustufen nach CML Färbung	Mittelwert CML gerundet	Mittlere Standard-abweichung (gerundet)
8896	1433,1	1433	215,7	1828,0	1828	122,0
8947	1250,8	1251	311,6	1878,5	1879	161,8
9004	1057,6	1058	336,5	1413,6	1414	151,2
9028	934,6	935	286,5	1764,6	1765	152,8
9068	987,1	987	321,3	3629,6	3630	288,0
9069	1321,0	1321	212,5	1527,6	1528	128,3
9116	1255,4	1255	271,1	3896,9	3897	317,9
9179	1064,6	1065	275,3	3794,0	3794	183,8

5.2.1 Zusammenhänge zwischen densitometrischen Daten und Histomorphometrie- sowie laborchemischen Parametern

Bei den Korrelationen ging es um den Versuch, Zusammenhänge zwischen den densitometrischen Daten der CML- und Imidazolonanfärbung mit laborchemischen, histomorphometrischen und anamnestischen Daten der Patienten darzustellen.

Zu folgenden histomorphometrischen Werten wurden signifikante Zusammenhänge gefunden: OV/BV, OS/BS, Oth, ES/BS, OcS/BS. Diese werden im Folgenden graphisch dargestellt.

Keine signifikante Korrelation zeigten BV/TV, MS/BS und MAR.

Bei den Laborparametern wurden lediglich zu iPTH und BioPTH signifikante Zusammenhänge gefunden.

Die histomorphometrische Diagnose korrelierte mit der CML-Anfärbung. Außerdem korrelierten CML- und Imidazolon-Anfärbung miteinander.

Zu anamnestischen Daten wie Alter, Diagnose Dialysetyp und -dauer, Medikation, der Grunderkrankung fand sich kein signifikanter Zusammenhang.

Es zeigte sich eine Korrelation der Anfärbung von CML und Imidazolon (Pearson $r = 0,805$, $p = 0,000$; Spearman $r = 0,650$, $p = 0,000$).

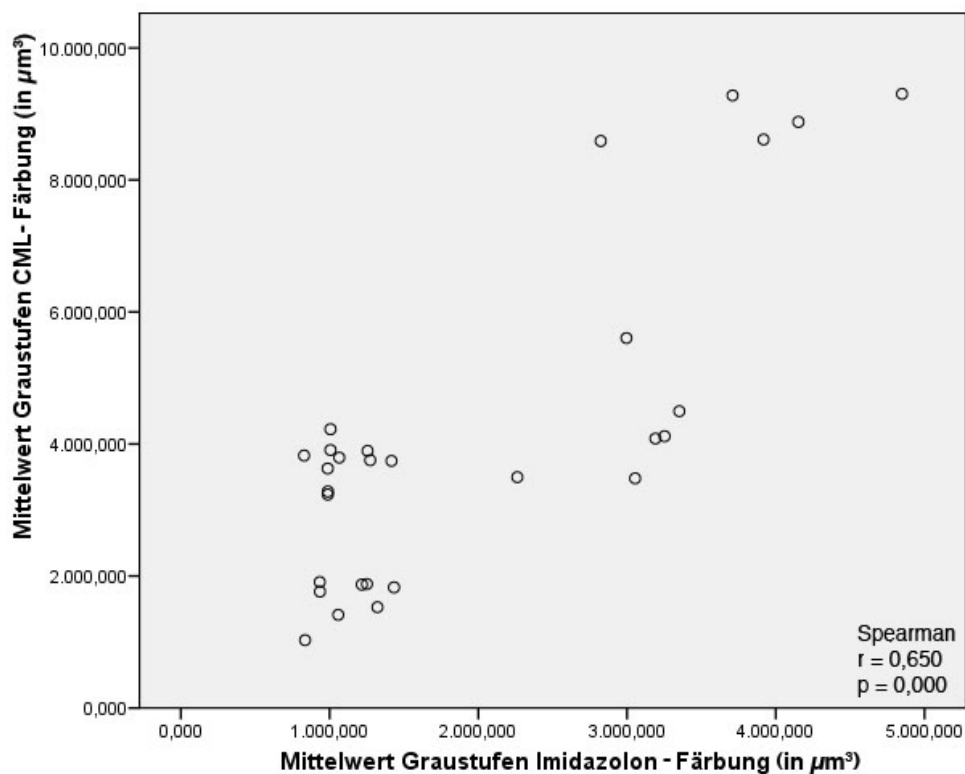


Abbildung 15: Korrelation CML-/Imidazolon-Anfärbung im Knochen

Es bestand eine (negative) Korrelation zwischen der histomorphometrischen Diagnose und der CML-Anfärbung (Pearson $r = -0,484$, $p = 0,008$, Spearman $r = -0,543$, $p = 0,002$) und Imidazolonanfärbung (Pearson $r = -0,450$, $p = 0,014$, jedoch nicht für Spearman $r = -0,285$, $p = 0,134$)

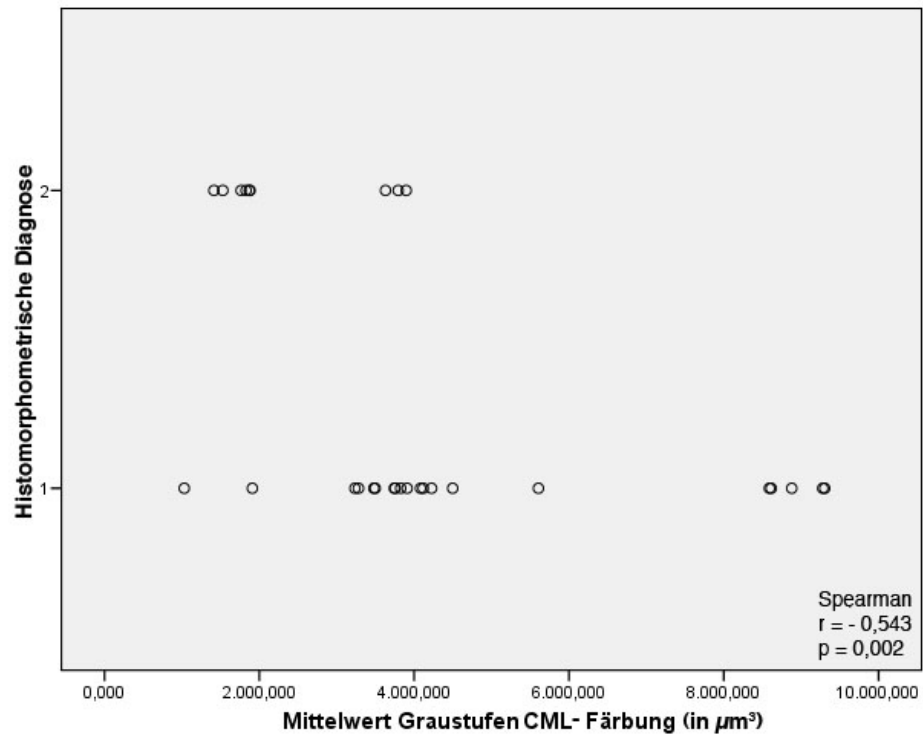


Abbildung 16: Korrelation histomorphometrische Diagnose (1= Osteitis Fibrosa, 2=Adynamie Form) mit CML-Ablagerung

Korrelationen mit histomorphometrischen Parametern

Sowohl die CML- (Pearson $r = 0,725$, $p = 0,000$, Spearman $r = 0,393$, $p = 0,035$) als auch Imidazolon-Ablagerung (Pearson $r = 0,659$, $p = 0,000$, Spearman $r = 0,494$, $p = 0,006$) zeigten Korrelationen zu OV/BV.

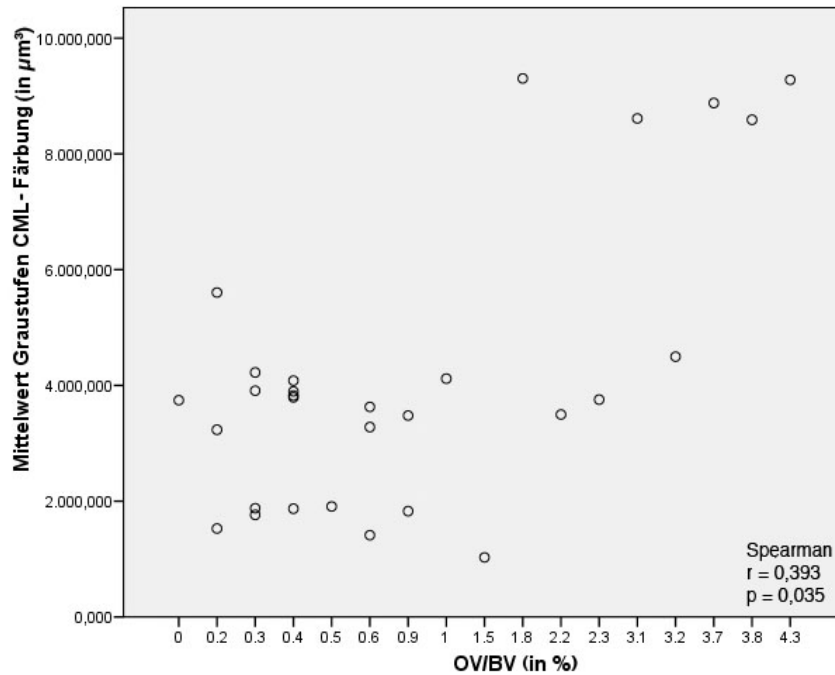


Abbildung 17: Korrelation CML-Ablagerung mit OV/BV

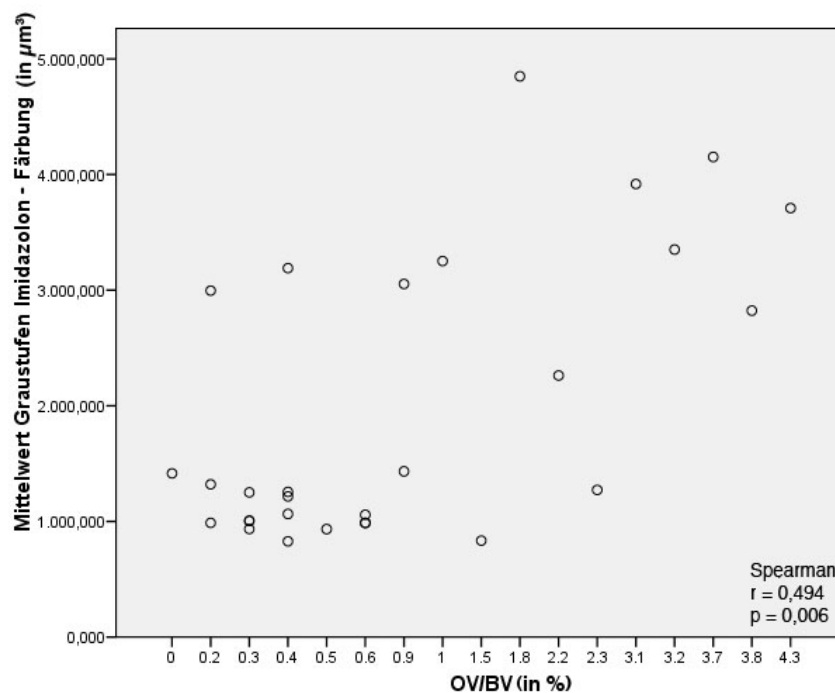


Abbildung 18: Korrelation Imidazolone-Ablagerung mit OV/BV

Auch OS/BS korrelierte mit den CML- (Pearson $r = 0,622$, $p = 0,000$, Spearman $r = 0,536$, $p = 0,003$) und Imidazolon-Ablagerungen (Pearson $r = 0,719$, $p = 0,000$, Spearman $r = 0,584$, $p = 0,001$).

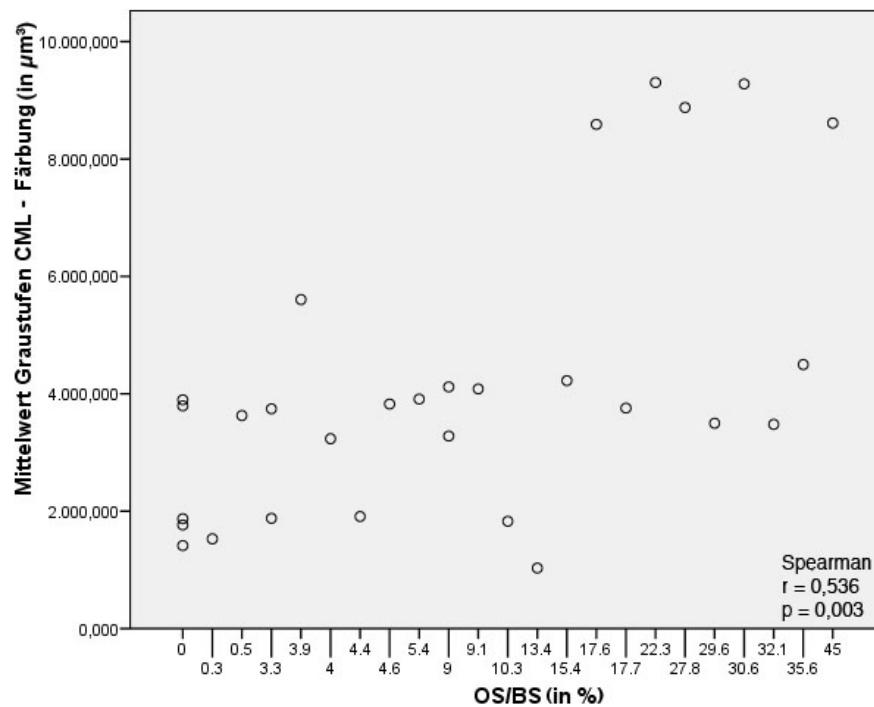


Abbildung 19: Korrelation CML-Ablagerung mit OS/BS

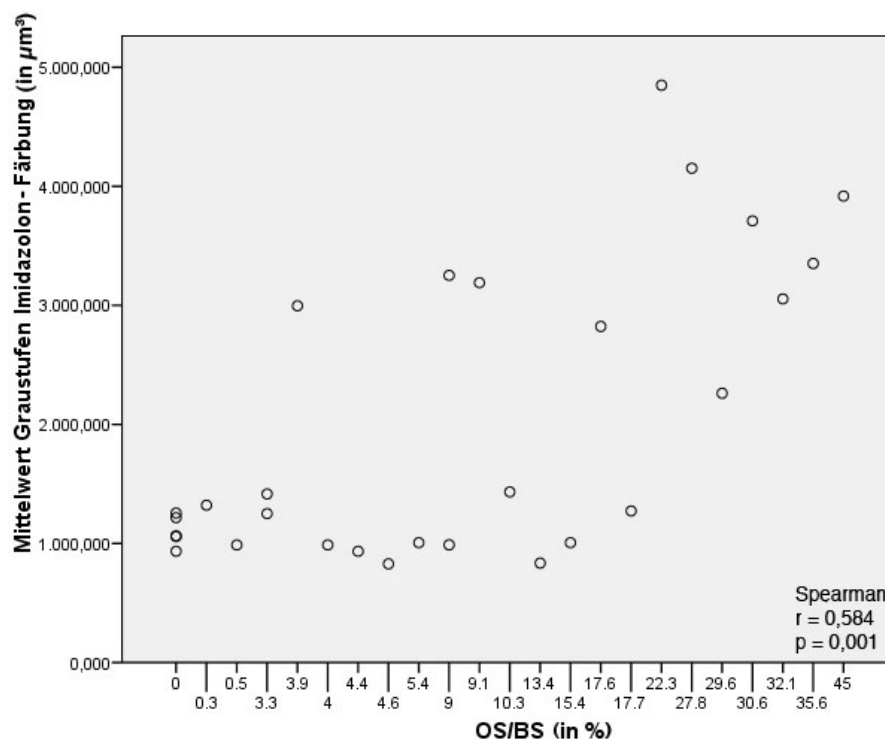


Abbildung 20: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit OS/BS

ObS/BS zeigte signifikante Korrelationen zur CML- (Pearson r 0,596, p 0,001, Spearman r 0,568, p 0,001) und Imidazolon-Ablagerung (Pearson r 0,678, p 0,000, Spearman r 0,518, p 0,004).

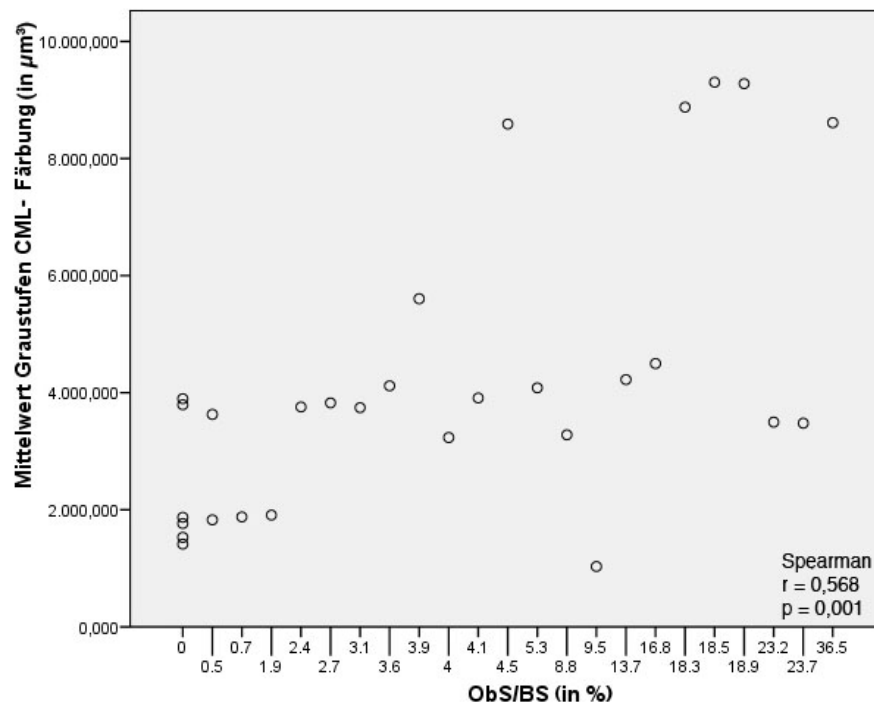


Abbildung 21: Korrelation CML-Ablagerung mit ObS/BS

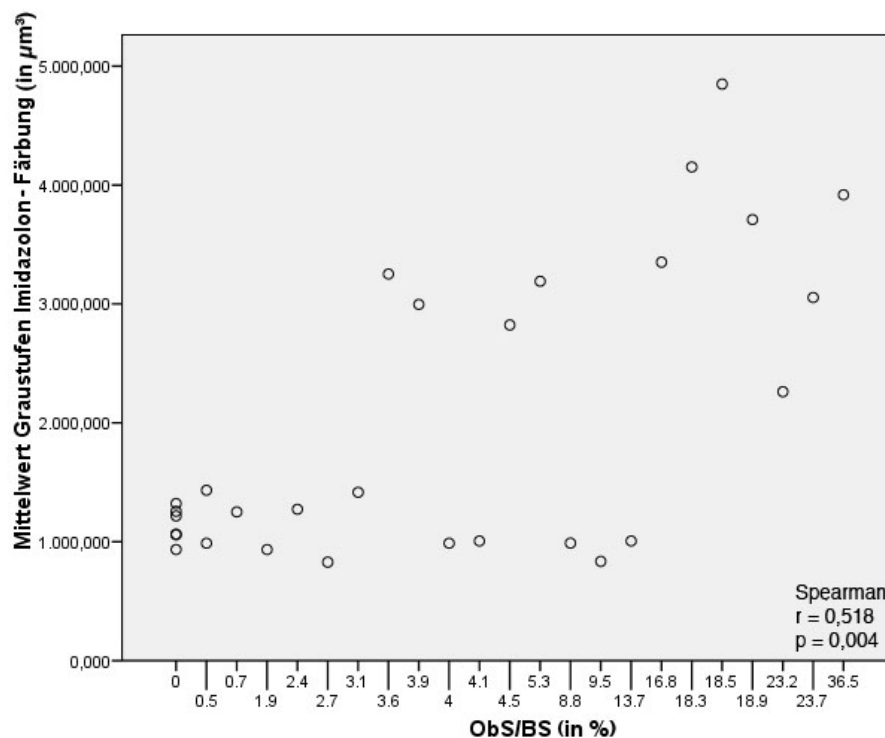


Abbildung 22: Korrelation-Ablagerung Imidazolon mit ObS/BS

Oth war nicht signifikant zu den CML-Ablagerungen (Pearson $r = -0,341$, $p = 0,071$; Spearman $r = 0,147$, $p = -0,276$), negativ zu Imidazolon-Ablagerungen korreliert (Pearson $r = -0,385$, $p = 0,039$; Spearman $r = -0,193$, $p = 0,316$).

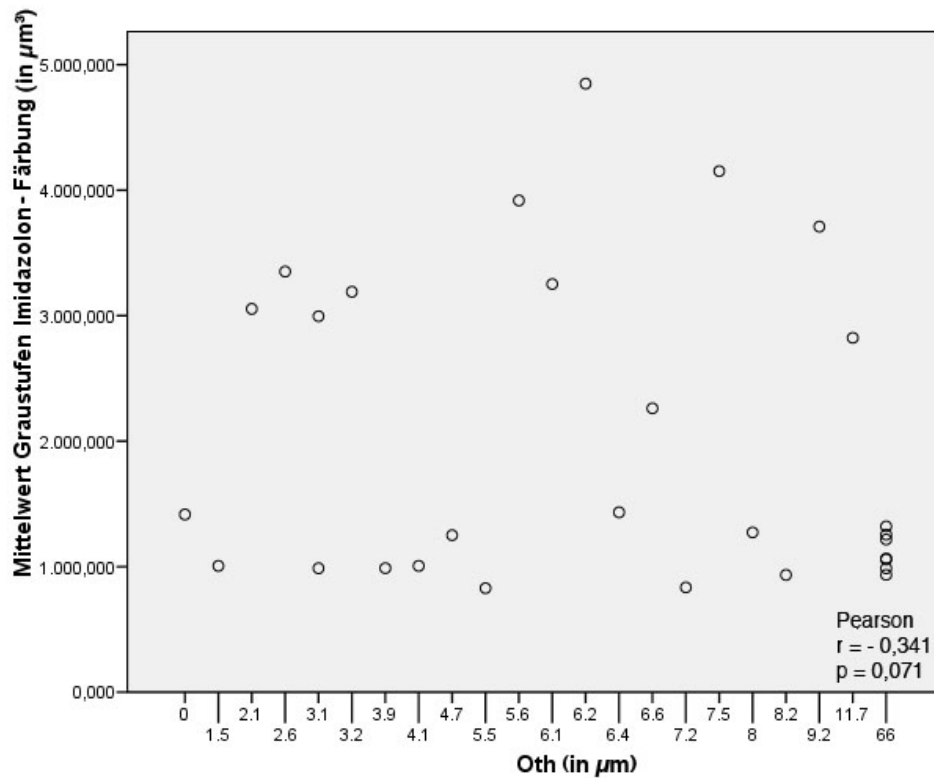


Abbildung 23: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit Oth

ES/BS korrelierte signifikant sowohl mit dem CML- (Pearson r 0,521, p Spearman r 0,579, p 0,001) als auch Imidazolon-Nachweis (Pearson r 0,592, Spearman r 0,492, p 0,007).

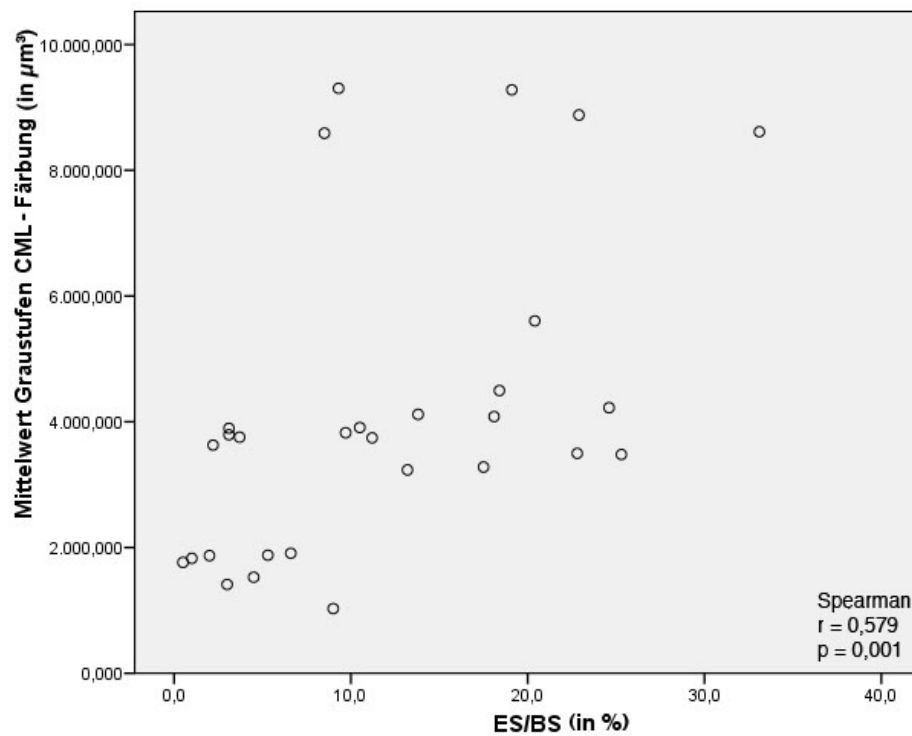


Abbildung 24: Korrelation CML-Ablagerung mit ES/BS

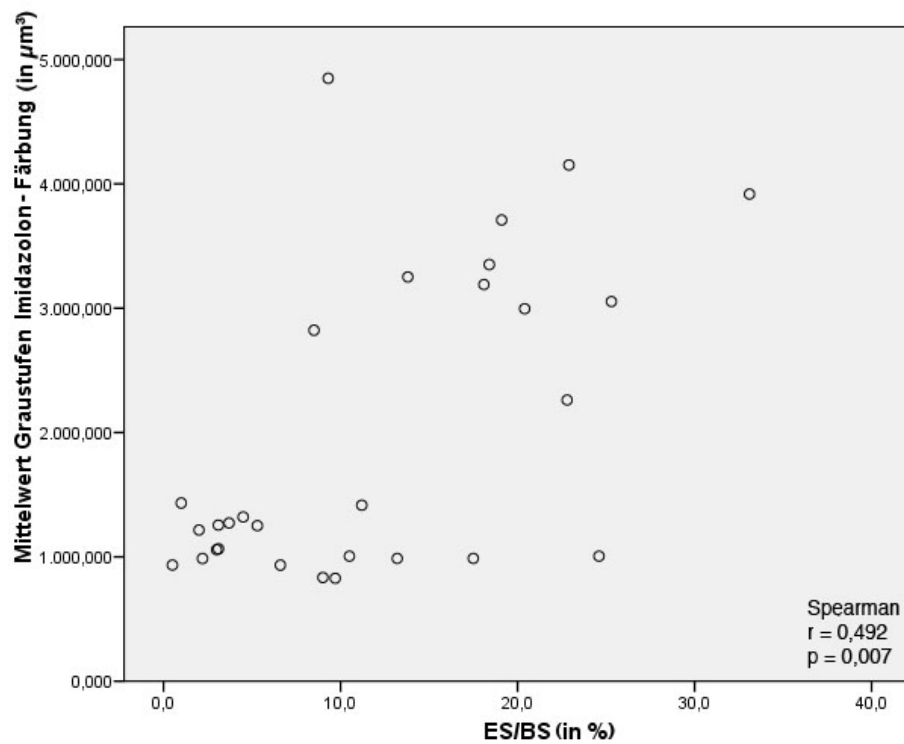


Abbildung 25: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit ES/BS

OcS/BS korrelierte sowohl mit dem CML- (Pearson r 0,581, p 0,001, Spearman r 0,652, p 0,006) als auch Imidazolon-Nachweis (Pearson r 0,616, p 0,000, Spearman r 0,532, p 0,003).

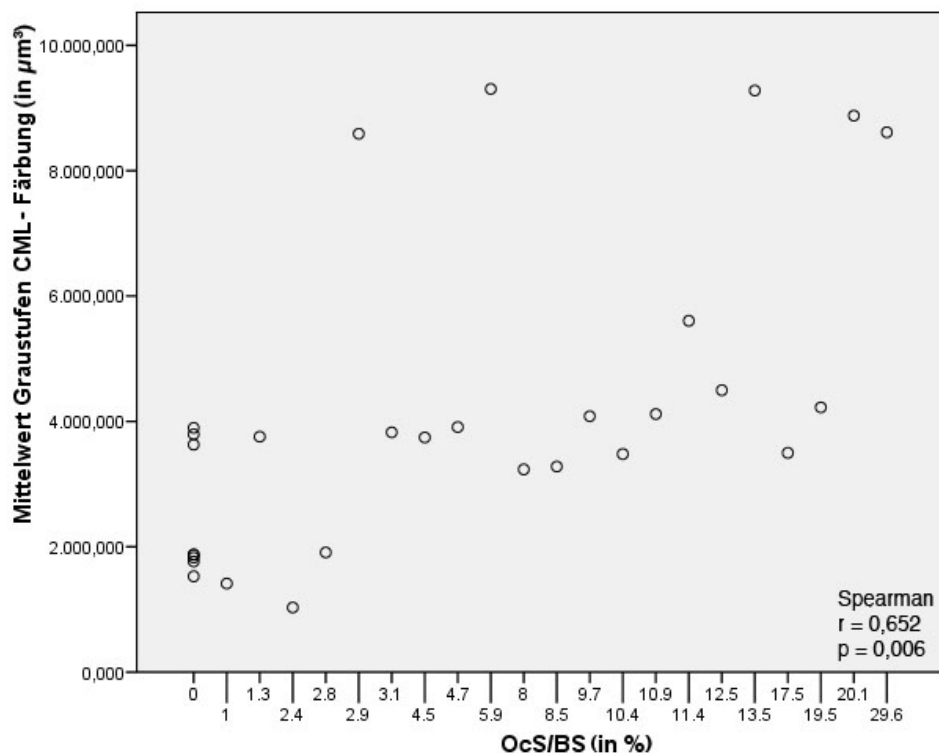


Abbildung 26: Korrelation CML-Ablagerung mit OcS/BS

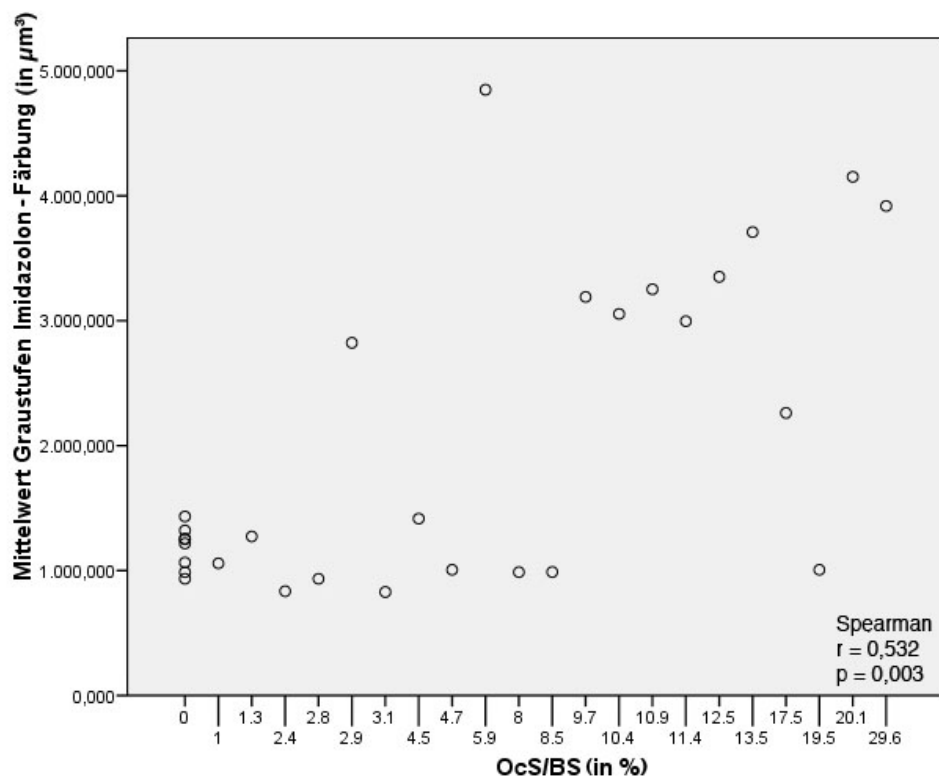


Abbildung 27: Korrelation Imidazolon-Ablagerung mit OcS/BS

Korrelation zu laborchemischen Parametern

iPTH und BioPTH korrelierten sowohl mit den CML- als auch Imidazolon-Anfärbungsintensitäten:

iPTH zu CML (Pearson $r = 0,581$, $p = 0,005$, Spearman $r = 0,442$, $p = 0,039$), Pearsonkorrelationskoeffizient für Imidazolon nicht signifikant (Pearson $r = 0,409$, $p = 0,058$, Spearman $r = 0,462$, $p = 0,030$).

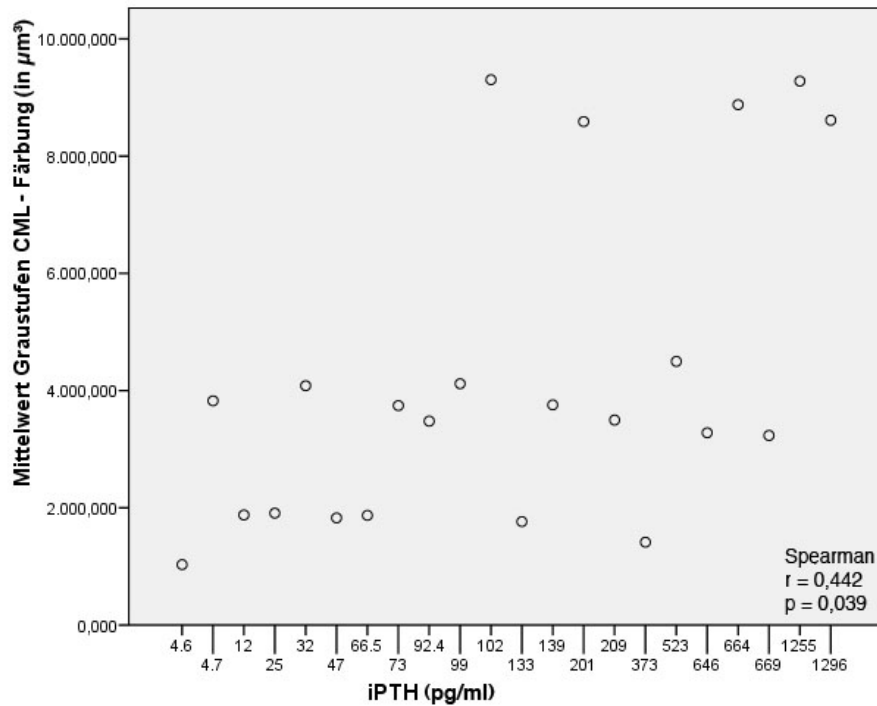


Abbildung 28: Korrelation CML-Ablagerung mit iPTH

BioPTH korrelierte mit CML (Pearson $r = 0,605$, $p = 0,037$, Spearman $r = 0,769$, $p = 0,003$), Pearsonkorrelationskoeffizient für Imidazolon nicht signifikant (Pearson $r = 0,522$, $p = 0,082$, Spearman $r = 0,650$, $p = 0,022$).

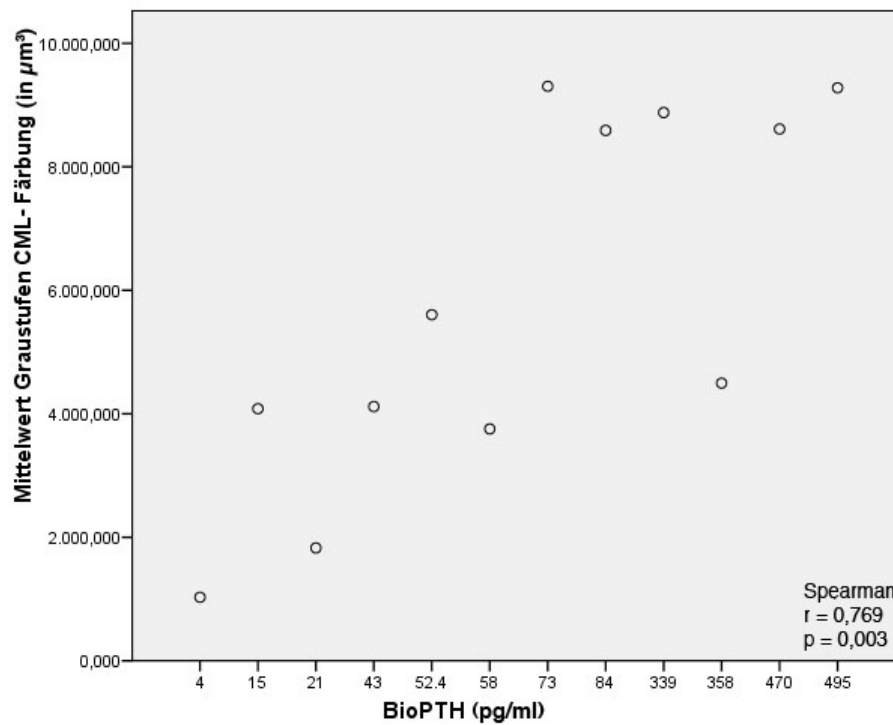


Abbildung 29: Korrelation CML-Ablagerung mit BioPTH

6. Diskussion

Die renale Osteodystrophie entwickelt sich in den frühen Stadien der Niereninsuffizienz durch den Verlust der exkretorischen und inkretorischen Nierenfunktion.

Schon zu einem frühen Zeitpunkt der CNI treten ossäre Veränderungen auf (Rix et al. 1999). Im Stadium 3 der chronischen Niereninsuffizienz (GFR unter 60ml/min) leiden 75-100% der Patienten an einer renalen Osteodystrophie (Elder 2002).

AGEs werden hauptsächlich über die Nieren ausgeschieden. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz kommt es zu einem Anstieg der AGE-Serumkonzentration und Ablagerung im Gewebe (Makita et al. 1991). So konnten mehrere Autoren nachweisen, dass der Serumspiegel der AGEs mit der GFR beziehungsweise mit dem Schweregrad der Nephropathie korreliert (Linden et al. 2008, Makita et al. 1991).

In verschiedenen Studien sind bei Dialysepatienten fünf bis fünfzehnfach erhöhte totale Pentosidinplasmaspiegel und 10fach erhöhte albumingebundene Pentosidinspiegel vor Beginn der Dialyse gemessen worden (Stein et al. 1999, Stein et al. 2001, van Tellingen et al. 2005). Durch die Hämodialyse können die Pentosidinspiegel, um 30-70% gesenkt werden (Stein et al. 1999, Stein et al. 2001, van Tellingen et al. 2005).

Freies Pentosidin wird durch alle Dialysemembranen eliminiert, wobei Super-FLUX-Membranen eine signifikant höhere Ausscheidung bewirken (Stein et al. 1999, Stein et al. 2001).

Durch die Super-FLUX-Dialyse konnte auch eine fast 30%ige Reduktion des proteingebundenen Pentosidin erreicht werden (Stein et al. 2001).

Bei den CAPD (Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis) -Patienten war das freie Pentosidin signifikant niedriger als bei Hämodialysepatienten. Das albumingebundene Pentosidin differierte zwischen den Dialysearten nicht (Friedlander et al. 1996, Miyata et al. 1997b).

6 Monate nach Nierentransplantation war das freie Pentosidin nicht mehr nachweisbar, jedoch das albumingebundene Pentosidin blieb noch über dem Normalwert. Wahrscheinlich sinkt die AGE-Kumulation im Gewebe nach Nierentransplantation (Friedlander et al. 1996, Miyata et al. 1997b).

Nach Nierentransplantation persistiert die renale Osteodystrophie häufig, insbesondere die high-turnover Formen. Die Knochenerkrankung wird getriggert durch Kortikosteroide und die immunsuppressive Therapie. Ein enges Monitoring ist daher notwendig (Lehmann et al. 2007). AGEs wurden mit der Entstehung einer Reihe von Langzeitkomplikationen der chronischen Niereninsuffizienz in Verbindung gebracht, wie Dialyse assoziierte Arthropathie, Neuropathie und Atherosklerose (van Tellingen et al. 2005).

AGEs wurden in Gefäßen, Augenlinsen, Haut, Kollagen, Tubuluszellen der Niere und in der Intima und Media von Arterien (Ahmed et al. 1997, Frye et al. 1998, Kent et al. 1985, Makita et al. 1991, Niwa et al. 1997) nachgewiesen.

Da AGEs vor allem in stoffwechselträgen Geweben nachgewiesen wurden, lag der Verdacht nahe, dass sie sich auch im Knochengewebe nachweisen lassen.

In dieser Arbeit wurden Knochenschnitte von Patienten mit verschiedenen Formen einer renalen Osteodystrophie angefertigt, immunhistochemisch gefärbt und lichtmikroskopisch bezüglich der AGE-Strukturen CML und Imidazolon untersucht. Außerdem wurden die Schnitte im Schwarz-Weiß-Modus meanderförmig erfasst und die Grauwerte pro Fläche ermittelt, um eine Aussage über die Anfärbeintensität und damit über die AGE-Beladung machen zu können.

Die Hauptfrage der Arbeit war, ob sich die AGEs CML und Imidazolon bei Patienten mit ROD am Knochenschnitt nachweisen lassen und welche Auswirkungen bezüglich der histologischen und histomorphometrischen Veränderungen abgeleitet werden können sind also AGE im Knochen an der Pathogenese der ROD beteiligt?

In der immunhistochemischen Anfärbung konnte im Knochen sowohl eine AGE-Beladung mit CML als auch mit Imidazolon nachgewiesen werden.

Es zeigte sich eine unterschiedliche Anfärbung der Spongiosa bei CML und Imidazolon. CML war vor allem im Knochenmark nachweisbar, die Trabekel blieben weitestgehend ungefärbt.

Imidazolon dagegen lagerte sich deutlich in den Trabekeln ab, während das Mark schwächer angefärbt wurde. Insgesamt zeigten sich deutlich höhere Anfärbeintensitäten für Imidazolon. Von Weiss wird vermutet, dass diese Unterschiede der Anreicherungen in den differenten Entstehungsmechanismen der AGEs liegen (Weiss 2006).

CML entsteht durch Autooxidation von Glukose oder Ascorbinsäure sowie durch Metallionen-katalysierte oxidative Fragmentation (Ahmed et al. 1986, Bierhaus et al., Thorpe

Baynes 2003). Auch bei Imidazolon reagiert Glukose mit Proteinaminogruppen zu einer Schiffchen-Base, welche in ein Amadoriprodukt umgewandelt wird. Dieses unterläuft mehrfachen Dehydratationen und Umlagerungen, woraus das hochreaktive 3-Deoxoglukosane entsteht. Dieses reagiert erneut mit N- α -benzoylarginin Amid zu Imidazolon A und B (Niwa et al. 1997).

Im Gegensatz zu CML entsteht Imidazolon also nicht oxidativ (Bierhaus et al. 1998, Niwa et al. 1997, Thorpe Baynes 2003).

So kann die Hypothese gestellt werden das aufgrund der differenten Entstehungswege von CML und Imidazolon sich beide AGEs unterschiedlich im Knochengewebe ablagern.

Außerdem zeigten Anderson et al. und Bierhaus et al., dass die Myeloperoxidase in Gewebsmakrophagen und neutrophilen Granulozyten die Bildung von CML fördert. Die Myeloperoxidase spielt bei der Regulierung inflammatorischer Prozesse eine entscheidende Rolle (Anderson et al. 1999, Bierhaus et al. 1998). Franke et al. konnten eine Aktivierung von NF κ B durch AGEs zeigen, sowie die Steigerung der mRNA-Expression von proinflammatorischen Zytokinen TNF α und IL6 (Franke et al. 2009). AGE regen außerdem Osteoblasten zur Produktion von IL6 an (Takagi et al. 1997). Auch konnte nachgewiesen werden dass AGEs über die Bindung an RAGE oxidativen Streß, welcher letztlich zur Aktivierung von TNF α führt, verursachen können (Yan et al. 1994). Dies könnte erklären, warum CML insbesondere in den Zellen des Knochenmarkes stärker nachgewiesen wurde, da diese aufgrund der ständigen Differenzierung eher einem oxidativem Stress unterliegen als die sich weniger verändernden Trabekelstrukturen.

So kann die Hypothese formuliert werden das CML sich aufgrund seiner oxidativen Entstehungsweise insbesondere in Zellen des Knochenmarks, welche vermehrt oxidativen Stress ausgesetzt sind, nachweisen ließ.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich eine Korrelation der Anfärbung von CML und Imidazolon (Pearson r 0,805, p 0,000, Spearman r 0,650, p 0,000). Wie schon von Weiss vermutet, könnte diesem Ergebnis der initial gleiche Entstehungsweg zugrunde liegen (Weiss 2006).

Es kann die Hypothese formuliert werden: aufgrund des initial gleichen Entstehungswegs von CML und Imidazolon korrelierten die Anfärbungsintensitäten.

Als zweites stellte sich die Frage ob es Unterschiede der AGE-Ablagerung zwischen den verschiedenen ROD Formen gibt.

Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der histomorphometrischen Diagnose und der CML-Anfärbung (Pearson r 0,484 p 0,008, Spearman r 0,543, p 0,002). Bei der Imidazolon-Anfärbung zeigte sich nur eine Korrelation zum Koeffizient Pearson (r 0,450, p 0,014), jedoch nicht für Spearman (r 0,285, p 0,134).

Die adyname Form zeigte deutlich höhere Anfärbeintensitäten für die AGEs, was ein Hinweis für den veränderten Knochenstoffwechsel bei dieser Form sein könnte, histologisch kenntlich durch eine Abnahme von Osteoblasten und Osteoklasten. Es kann vermutet werden, dass es aufgrund des verminderten Knochenumbaus und damit verminderten Stoffwechsels zu höheren Ablagerungen von AGEs kommen kann, da das Knochengewebe wesentlich länger den AGEs ausgesetzt ist.

Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass AGEs bei der adynamen Form vermehrt abgelagert werden.

Schließlich wurde nach Zusammenhängen zwischen dem AGE-Nachweis im Knochenschnitt und histomorphometrischen, demographischen und laborchemischen Parametern gesucht.

Bei den histomorphometrischen Parametern wurden Korrelationen zu BV/TV, OV/BV, OS/BS, ObS/BS, Oth μ m, ES/BS, OcS/BS, MS/BS und MAR untersucht.

Es zeigten sich Korrelationen bei OcS/BS für CML- (Pearson r 0,581, p 0,001, Spearman r 0,652, p 0,006) als auch Imidazolon-Ablagerungen (Pearson r 0,616, p 0,000, Spearman r 0,532, p 0,003) und auch ObS/BS korrelierte signifikant zu CML- (Pearson r 0,596, p 0,001, Spearman r 0,568, p 0,001) und Imidazolon-Ablagerungen (Pearson r 0,678, p 0,000, Spearman r 0,518 p 0,004).

Dies kann ein Hinweis für zytoplasmatische AGE-Ablagerungen in den Osteoblasten und Osteoklasten sein. Der zytoplasmatische Nachweis von AGEs wurde von Weiss erbracht (Weiss 2006).

So kann die Hypothese aufgestellt werden, dass AGEs sich im Zytoplasma von Osteoblasten und Osteoklasten ablagern.

Es zeigte sich für Imidazolon eine negative Korrelation (Pearsonkorrelationskoeffizient) zur Osteoidsaumbreite (Oth), für CML war dies nicht nachweisbar. Möglicherweise liegt die Ursache in den unterschiedlichen Ablagerungsmustern, da sich Imidazolon im Gegensatz zu CML wesentlich stärker in den Trabekeln ablagert.

Zudem wurde von einigen Autoren über Veränderungen von Osteoblasten durch AGEs berichtet, woraus eine verminderte Leistung der Osteoblasten resultierte (Cortizo et al. 2003,

Franke et al. 2007, McCarthy et al. 1999, McCarthy et al. 2001 a, McCarthy et al. 2001 b, McCarthy et al. 2004).

So konnten Franke et al. nachweisen, dass bei Osteoblasten, die mit AGE-BSA behandelt wurden, die mRNA Expression der alkalischen Phosphatase und des Osteocalcins vermindert wird (Franke et al. 2007).

McCarthy berichtete über einen regulierenden Effekt der Akkumulation von AGEs in der extrazellulären Matrix des Knochens auf die Differenzierung und Proliferation von Osteoblasten. AGEs verändern das Wachstums-, Entwicklungs- und Mineralisierungspotenzial sowie die Sekretion von IGF-1 und IGFBPs von Osteoblasten. Die Rezeptor-AGE-Affinität sinkt mit steigendem Differenzierungsstadium der Osteoblasten. AGEs induzierten Hemmungen von extrazellulären Signal-regulierten Kinasen in späteren Stadien der Osteoblastenentwicklung. Dies könnte zu einem Abfall des Zellüberlebens und zu einem Abfall der osteoblastischen Knochenbildungskapazität führen (Cortizo et al. 2003, McCarthy et al. 1999, McCarthy et al. 2001 a, McCarthy et al. 2001 b, McCarthy et al. 2004). So kann die Hypothese formuliert werden AGEs hemmen die Osteoblastenleistung.

Für ES/BS zeigten sich signifikante Korrelationen sowohl für die CML- (Pearson r 0,521, p Spearman r 0,579, p 0,001) als auch für die Imidazolon-Anfärbung (Pearson r 0,592, Spearman r 0,492, p 0,007); die Osteoklastenaktivität war erhöht.

Takagi et al. wiesen nach, dass AGEs die Osteoblasten zur Produktion von IL6 anregen, welches die Osteoklastogenese stimuliert (Takagi et al. 1997). Odetti et al zeigten, dass mit Anstieg der Pentosidin-Spiegel die Knochendichte abnimmt (Odetti et al 2005).

Über AGE spezifische Rezeptoren oder Bindungsproteine (AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3, ScR-II, CD36 und RAGE) werden Radikale freigesetzt. RAGE ist der bekannteste Signaltransduktionsrezeptor für AGE aus der Immunglobulinsuperfamilie. Er bewirkt Veränderungen der Permeabilität, des Wachstums und der Thrombogenität. Es wird vermutet, dass RAGE eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Progression von renalen Schäden bei Diabetes mellitus Typ 1, aber auch bei nicht mit Diabetes assoziierten Nierenerkrankungen spielt (Esposito et al. 1989, Jensen et al. 2006, Abel et al. 1995, Valencia et al. 2004, Schmidt et al. 1994, Yonekura et al. 2003). Sowohl lösliche AGE-Rezeptoren als auch RAGE wurden direkt auf der Zelloberfläche nachgewiesen (Schmidt et al. 1994).

Von mehreren Autoren wurde vermutet, dass das gestörte Knochenremodeling aufgrund der Aktivierung von Osteoklasten durch NF- κ B, welches zu einer erhöhten Resorption führt,

durch AGEs getriggert wird (Neeper et al. 1992, Hein et al. 2006, Miyata et al. 1997 a, Schmidt et al. 1994). Im Knochen akkumulierte AGEs verändern Osteoblasten durch Aktivierung der AGE-RAGE-Interaktion (RAGE mRNA) und induzieren so eine erhöhte Osteoklastogenese und gestörte Matrixmineralisation (Franke et al. 2007, Kislinger et al. 1999).

Von Zhou et al. wird vermutet, dass die Regulation der Osteoklastogenese durch High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) über RAGE erfolgt. Dabei wird HMGB1 von BMMs (Bone Marrow Macrophages) in Abhängigkeit von der RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) -Stimulation freigesetzt. Die extrazelluläre HMGB1 reguliert größtenteils über RAGE das Remodeling, die Differenzierung und die Funktion des osteoklastischen Aktin-Zytoskeletts (Zhou et al. 2008).

So kann die Hypothese formuliert werden, dass AGEs die Osteoklastogenese steigern.

Sowohl für CML (Pearson r 0,725, p 0,000, Spearman r 0,393, p 0,035) als auch Imidazolon (Pearson r 0,659, p 0,000, Spearman r 0,494, p 0,006) zeigten sich Korrelationen zu OV/BV.

Auch bei OS/BS zeigten sich Korrelationen für CML (Pearson r 0,622, p 0,000, Spearman r 0,536, p 0,003) und Imidazolon (Pearson r 0,719, p 0,000, Spearman r 0,584, p 0,001).

Bei der renalen Osteodystrophie kommt es zu einer Vermehrung des Osteoids aufgrund verminderter Mineralisation. Es wurden von verschiedenen Autoren Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der AGE-Exposition und einer verminderten Matrixmineralisation gefunden (Cortizo et al. 2003, Franke et al. 2007, Mc Carthy et al. 2001).

So kann die Hypothese aufgestellt werden, dass AGEs die Matrixmineralisation vermindern.

Auch bei zwei laborchemischen Parametern iPTH und BioPTH bestanden Korrelationen für CML-Ablagerungen (iPTH für CML (Pearson r 0,581, p 0,005, Spearman r 0,442, p 0,039) BioPTH: CML (Pearson r 0,605, p 0,037, Spearman r 0,769, p 0,003)).

Aufgrund der Niereninsuffizienz kommt es zu Veränderungen des Elektrolythaushaltes, unter anderem kommt es zu einer Hypokalzämie. Aufgrund dessen wird über die Nebenschilddrüse vermehrt PTH ausgeschüttet, um den Kalziumspiegel im Normbereich zu halten. Dadurch kommt es zu einer Nebenschilddrüsenhyperplasie, welche permanent erhöhte PTH-Spiegel zur Folge hat. Intaktes Parathormon (iPTH 1-84/BioPTH) ist die aktive Form des Hormons. Dieses hemmt die Syntheseleistung von Osteoblasten und wirkt durch die Sekretion von Prostaglandinen indirekt stimulierend auf die Osteoklasten, um Kalzium bereitzustellen.

Möglicherweise korrelieren die PTH-Spiegel mit den AGE Beladungen, weil beide die gleichen Wirkungsweisen haben. Sowohl AGEs als auch PTH hemmen die Syntheseleistung von Osteoblasten und stimulieren die Osteoklastenaktivität.

Entgegen den Ergebnissen anderer Autoren (Thorpe Baynes 2003) konnte keine Korrelation der AGE-Ablagerungen zum Alter festgestellt werden. Allerdings muss hier sicher den Besonderheiten der renalen Osteodystrophie Rechnung getragen werden. So kann ein Nierenschaden schon im jungen Alter entstehen. Sobald jedoch eine Niereninsuffizienz besteht, kommt es zu einer Kumulation der AGEs in Abhängigkeit von der Stärke des Nierenschadens (Linden et al. 2008, Makita et al. 1991) unabhängig vom Alter.

Die beschriebenen Ergebnisse lassen eine pathogenetische Bedeutung der AGEs bei der Entstehung der renalen Osteodystrophie durch Hemmung der Matrixmineralisation, Steigerung der Osteoklastogenese und Hemmung der Osteoblastenleistung annehmen.

Bei der immunhistochemischen Färbung waren zwei Färbungsansätze notwendig. Dabei wurden jeweils die Antikörper mit gleicher Verdünnung neu hergestellt. Im zweiten Färbungsansatz wurden zu der Gruppe der adynamen Form (9 Patienten) noch 7 Patienten mit Hyperparathyreoidismus gefärbt, welche jedoch ähnliche Grauwerte wie die 16 Patienten mit Hyperparathyreoidismus aus dem ersten Färbungsansatz zeigten.

Dadurch könnten die Färbungsunterschiede zwischen den zwei Gruppen der ROD beeinflusst sein. Es sind weitere Untersuchungen notwendig, die mit größeren Patientenzahlen die hier gefundenen Ergebnisse bestätigen.

Kritisch muss angemerkt werden, dass in dieser Arbeit von 4 Typen der renalen Osteodystrophie nur zwei untersucht wurden. Die Untersuchungen müssen also erweitert werden.

Es wurden beide Dialysemodalitäten nicht getrennt betrachtet; auch hier sind weitere Studien nötig.

Literaturverzeichnis

- (Abel et al. 1995) Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J et al. 1995. Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. *NDT*, 10(9):1662-1667.
- (Ahmed et al. 1986) Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. 1986. Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *JBC*, 261(11):4889-4894.
- (Ahmed et al. 1997) Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. 1997. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *BJ*, 324(Pt 2):565-70.
- (Anderson et al. 1999) Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. 1999. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *JCI*, 104(1):103-113.
- (Andress et al. 2008) Andress DL, Coyne DW, Kalantar-Zadeh K, Molitch ME, Zangeneh F, Sprague SM. 2008. Management of secondary hyperparathyroidism in stages 3 and 4 chronic kidney disease. *Endocrine practice*, 14(1):18-27.
- (Bailie et al. 2006) Bailie GR, Johnson CA, Mason NA, St. Peter WL. 2006. Chronic Kidney Disease 2006: A Guide to Select NKF-KDOQI Guidelines and Recommendations.
- (Bierhaus et al. 1998) Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovascular research*, 37(3):586-600.
- (Brownlee 1995) Brownlee M. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual review of medicine*, 46:223-234.
- (Coen et al. 1998) Coen G, Ballanti P, Bonucci E, Calabria S, Centorrino M, Fassino V, Manni M, Mantella D, Mazzaferro S, Napoletano I, Sardella D, Taggi F. 1998. Bone markers in the diagnosis of low turnover osteodystrophy in haemodialysis patients. *NDT*, 13(9):2294-2302.
- (Coen et al. 2002) Coen G, Ballanti P, Balducci A, Calabria S, Fischer MS, Jankovic L, Manni M, Morosetti M, Moscaritolo E, Sardella D, Bonucci E. 2002. Serum osteoprotegerin and renal osteodystrophy. *NDT*, 17(2):233-238.
- (Cortizo et al. 2003) Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA, Mercer N, Etcheverry SB, McCarthy AD. 2003. Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-

- regulated kinases (ERK). *Molecular and cellular biochemistry*, 250(1-2):1-10.
- (Couttenye et al. 1999) Couttenye MM, D'Haese PC, Verschoren WJ, Behets GJ, Schrooten I, De Broe ME. 1999. Low bone turnover in patients with renal failure. *Kidney international*. 73:S70-76.
- (Delling 1975) Delling G. 1975. *Endokrine Osteopathien: Morphologie, Histomorphometrie und Differentialdiagnose. (Veröffentlichungen aus der Pathologie)*. 1. Auflage. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- (Deuber 2001) Deuber HJ. 2001. Die Renale Osteopathie. *Dialyse-Journal*, 20(69):21-5.
- (Elder 2002) Elder G. 2002. Pathophysiology and recent advances in the management of renal osteodystrophy. *JBMR*; 17(12):2094-2105.
- (Esposito et al. 1989) Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H. 1989. Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *JEM*, 170(4):1387-1407.
- (Felsenfeld Llach 1993) Felsenfeld AJ, Llach F. 1993. Parathyroid gland function in chronic renal failure. *Kidney international*, 43(4):771-789.
- (Ferreira 1998) Ferreira A. 1998. Biochemical markers of bone turnover in the diagnosis of renal osteodystrophy: what do we have, what do we need? *NDT*, 13(Suppl 3):29-32.
- (Ferreira Drüeke 2000) Ferreira A, Drüeke TB. 2000. Biological markers in the diagnosis of the different forms of renal osteodystrophy. *The American journal of the medical sciences*, 320(2):85-89.
- (Ferreira 2006) Ferreira A. 2006. Development of renal bone disease. *EJCI*, 36(Suppl 2):2-12.
- (Franke et al. 2007) Franke S, Siggelkow H, Wolf G, Hein G. 2007. Advanced glycation endproducts influence the mRNA expression of RAGE, RANKL and various osteoblastic genes in human osteoblasts. *Archives of physiology and biochemistry*, 113(3):154-161.
- (Franke et al. 2009) Franke S, Sommer M, Rüster C, Bondeva T, Marticke J, Hofmann G, Hein G, Wolf G. 2009. Advanced glycation end products induce cell cycle arrest and proinflammatory changes in osteoarthritic fibroblast-like synovial cells. *Arthritis Research & Therapy*, 11(5):R136.
- (Frei Schober-Halstenberg 2008) Frei U, Schober-Halstenberg H-J. 2008. *Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007*.
- (Friedlander et al. 1996) Friedlander MA, Wu YC, Elgawish A, Monnier VM. 1996. Early and advanced glycosylation end products. Kinetics of

- formation and clearance in peritoneal dialysis. JCI, 97(3):728-735.
- (Frye et al. 1998) Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. 1998. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. Advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium cross-links in human lens proteins. JBC, 273(30):18714-18719.
- (Fukuda et al. 1993) Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, Fukagawa M, Kurokawa K, Seino Y. 1993. Decreased 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. JCI, 92(3):1436-1443.
- (Gal-Moscovici Sprague 2007) Gal-Moscovici A, Sprague SM. 2007. Bone health in chronic kidney disease-mineral and bone disease. Advances in chronic kidney disease, 14(1):27-36.
- (González Martin 2001) González EA Martin KJ. 2001. Renal osteodystrophy. Reviews Endocrine & Metabolic Disorders, 2(2):187-193.
- (Haris et al. 2006) Haris A, Sherrard DJ, Hercz G. 2006. Reversal of adynamic bone disease by lowering of dialysate calcium. Kidney international, 70(5):931-937.
- (Hein 2006) Hein GE. 2006. Glycation endproducts in osteoporosis-is there a pathophysiologic importance? Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 371(1-2):32-36
- (Hein et al. 2006) Hein G, Weiss C, Lehmann G, Niwa T, Stein G, Franke S. 2006. Advanced glycation end product modification of bone proteins and bone remodelling: hypothesis and preliminary immunohistochemical findings. Annals of the rheumatic diseases, 65(1):101-104.
- (Hercz 2001) Hercz G. 2001. Regulation of bone remodeling: impact of novel therapies. Seminars in dialysis, 14(1):55-60.
- (Hruska Teitelbaum 1995) Hruska KA, Teitelbaum SL. 1995. Renal osteodystrophy. NEJM, 333(3):166-174.
- (Hruska 1997) Hruska KA. 1997. Renal osteodystrophy. Baillière's clinical endocrinology and metabolism, 11(1):165-194.
- (Hruska 1998) Hruska K. 1998. New concepts in renal osteodystrophy. NDT, 13(11):2755-2760.
- (Hruska et al. 2007) Hruska KA, Saab G, Mathew S, Lund R. 2007. Renal osteodystrophy, phosphate homeostasis, and vascular calcification. Seminars in dialysis, 20(4):309-315.
- (Jehle et al. 2000) Jehle PM, Ostertag A, Schulten K, Schulz W, Jehle DR, Stracke S, Fiedler R, Deuber HJ, Keller F, Boehm BO, Baylink DJ, Mohan S. 2000. Insulin-like growth factor system components in hyperparathyroidism and renal osteodystrophy. Kidney international, 57(2):423-36.
- (Jensen et al. 2006) Jensen LJ, Denner L, Schrijvers BF, Tilton RG, Rasch R, Flyvbjerg A. 2006. Renal effects of a neutralising RAGE-

- antibody in long-term streptozotocin-diabetic mice. *The Journal of endocrinology*, 188(3):493-501.
- (Joy et al. 2007) Joy MS, Karagiannis PC, Peyerl FW. 2007. Outcomes of secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease and the direct costs of treatment: *JMCP*, 13(5):397-411.
- (Kent et al. 1985) Kent MJ, Light ND, Bailey AJ. 1985. Evidence for glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosylation in vitro. *BJ*, 225(3):745-752.
- (Kislinger et al. 1999) Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. 1999. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *JBC*, 274(44):31740-31749.
- (Krpán 2001) Krpán D. 2001. Die Rolle der Knochenbiopsie bei der Diagnose der renalen Osteopathie - Erfahrungen aus 15 Jahren. *Dialyse-Journal*, 20(69):37-47.
- (Lehmann et al. 2008) Lehmann G, Ott U, Kaemmerer D, Schuetze J, Wolf G. 2008. Bone histomorphometry and biochemical markers of bone turnover in patients with chronic kidney disease Stages 3 - 5. *Clinical nephrology*, 70(4):296-305.
- (Linden 2008) Linden E, Cai W, He JC, Xue C, Li Z, Winston J, Vlassara H, Uribarri J. 2008. Endothelial Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease Results from Advanced Glycation End Products (AGE)-Mediated Inhibition of Endothelial Nitric Oxide Synthase through RAGE Activation. *CJASN*, 3(3):691-698.
- (Locatelli et al. 2002) Locatelli F, Cannata-Andía JB, Drüeke TB, Hörl WH, Fouque D, Heimbürger O, Ritz E. 2002. Management of disturbances of calcium and phosphate metabolism in chronic renal insufficiency, with emphasis on the control of hyperphosphataemia. *NDT*, 17(5):723-731.
- (Lund et al. 2006) Lund RJ, Davies MR, Mathew S, Hruska KA. 2006. New discoveries in the pathogenesis of renal osteodystrophy. *JBMM*, 24(2):169-171.
- (Makita et al. 1991) Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. 1991. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *NEJM*. 325(12):836-842.
- (Malluche et al. 1976) Malluche HH, Ritz E, Lange HP, Kutschera L, Hodgson M, Seiffert U, Schoeppe W. 1976. Bone histology in incipient and advanced renal failure. *Kidney International*, 9(4):355-62.
- (Malluche Faugere 1990) Malluche H, Faugere MC. 1990. Renal bone disease 1990: an unmet challenge for the nephrologist. *Kidney international*, 38(2):193-211.

- (Malluche et al. 1999) Malluche HH, Langub MC, Monier-Faugère MC. 1999. The role of bone biopsy in clinical practice and research. *Kidney international*, 73:S20-5.
- (Malluche et al. 2004) Malluche HH, Mawad H, Monier-Faugere MC. 2004. The importance of bone health in end-stage renal disease: out of the frying pan, into the fire? *NDT*, 19(Suppl 1):i9-13.
- (Martin González 2007) Martin KJ, González EA. 2007. Metabolic bone disease in chronic kidney disease, *JASN*, 18(3):875-885.
- (McCarthy et al. 1999) McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM. 1999. Advanced glycation endproduct-specific receptors in rat and mouse osteoblast-like cells: regulation with stages of differentiation. *Acta diabetologica*, 36(1-2):45-52.
- (McCarthy et al. 2001a) McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM. 2001. Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta diabetologica*, 38(3):113-22.
- (McCarthy et al. 2001b) McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM. 2001. Non-enzymatic glycosylation of a type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC cell biology*, 2:16.
- (McCarthy et al. 2004) McCarthy AD, Uemura T, Etcheverry SB, Cortizo AM. 2004. Advanced glycation endproducts interfere with integrin-mediated osteoblastic attachment to a type-I collagen matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(5):840-848.
- (Miyata et al. 1997a) Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, Taketomi S. 1997. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles.: *JASN*, 1997; 8(2):260-270.
- (Miyata et al. 1997b) Miyata T, Ueda Y, Yoshida A, Sugiyama S, Iida Y, Jadoul M, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. 1997. Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product, by different modalities of renal replacement therapy. *Kidney international*, 51(3):880-887.
- (Moe et al. 2006) Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G. 2006. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney international*, 69(11):1945-1953.
- (Neeper et al. 1992) Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. 1992. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *JBC*, 267(21):14998-5004.

- (Niwa et al. 1997) Niwa T, Katsuzaki T, Miyazaki S, Miyazaki T, Ishizaki Y, Hayase F, Tatemichi N, Takei Y. 1997. Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *JCI*, 99(6):1272-1280.
- (Odetti et al. 2005) Odetti P, Rossi S, Monacelli F, Poggi A, Cirnigliaro M, Federici M, Federici A. 2005. Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043:710-717.
- (Parfitt et al. 1987) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR. 1987. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *JBMR*, 2(6):595-610.
- (Rix et al. 1999) Rix M, Andreassen H, Eskildsen P, Langdahl B, Olgaard K. 1999. Bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in patients with predialysis chronic renal failure. *Kidney international*, 56(3):1084-1093.
- (Schleicher et al. 1997) Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. 1997. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *JCI*, 99(3):457-468.
- (Schmidt et al. 1993) Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D. 1993. Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *JCI*, 91(5):2155-2168.
- (Schmidt et al. 1994) Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. 1994. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *ATVB*, 14(10):1521-1528.
- (Schumock Sprague 2007) Schumock GT, Sprague SM. 2007. Clinical and economic burden of fractures in patients with renal osteodystrophy. *Clinical nephrology*, 67(4):201-208.
- (Sherrard et al. 1993) Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, Maloney NA, Greenwood C, Manuel A, Saiphoo C, Fenton SS, Segre GV. 1993. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure-an evolving disorder. *Kidney international*, 43(2):436-442.
- (Slatopolsky et al. 2003) Slatopolsky E, Gonzalez E, Martin K. 2003. Pathogenesis and treatment of renal osteodystrophy. *Blood purification*, 21(4-5):318-326.
- (Smith et al. 1994) Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. 1994. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *PNAS*, 91(12):5710-5714.

- (Spasovski 2007) Spasovski G. 2007. New aspects of treatment of renal bone disease in dialysis patients. *Prilozi*, 28(1):205-213.
- (Sprague 2000) Sprague SM. 2000. The role of the bone biopsy in the diagnosis of renal osteodystrophy. *Seminars in dialysis*, 13(3):152-155.
- (Stein et al. 1999) Stein G, Franke S, Sperschneider H, Vienken J, Ueda Y, Miyata T, Kurokawa K. 1999. Decrease in serum pentosidine levels of ESRD patients during polysulfone haemodialysis. *NDT*, 14(6):1603-1610.
- (Stein et al. 2001) Stein G, Franke S, Mahiout A, Schneider S, Sperschneider H, Borst S, Vienken J. 2001. Influence of dialysis modalities on serum AGE levels in end-stage renal disease patients. *NDT*, 16(5):999-1008.
- (Takagi et al. 1997) Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, Motomura T, Hashimoto K, Yamamoto H, Sato B, Okada S, Kishimoto T. 1997. Advanced glycation endproducts stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells. *JBMR*, 12(3):439-446.
- (Thorpe Baynes 2003) Thorpe SR, Baynes JW. 2003. Maillard reaction products in tissue proteins: new products and new perspectives. *Amino acids*, 25(3-4):275-281.
- (Torres et al. 1995) Torres A, Lorenzo V, Hernández D, Rodríguez JC, Concepción MT, Rodríguez AP, Hernández A, de Bonis E, Darias E, González-Posada JM et al. 1995. Bone disease in predialysis, hemodialysis, and CAPD patients: evidence of a better bone response to PTH. *Kidney international*, 47(5):1434-1442.
- (Ureña et al. 1996) Ureña P, Hruby M, Ferreira A, Ang KS, de Vernejoul MC. 1996. Plasma total versus bone alkaline phosphatase as markers of bone turnover in hemodialysis patients. *JASN*, 7:506-12.
- (Ureña et al. 2003) Ureña P, Bernard-Poenaru O, Ostertag A, Baudoin C, Cohen-Solal M, Cantor T, de Vernejoul MC. 2003. Bone mineral density, biochemical markers and skeletal fractures in haemodialysis patients. *NDT*, 18(11):2325-31.
- (Valencia et al. 2004) Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, Hughes TE. 2004. Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Analytical biochemistry*, 324(1):68-78.
- (van Tellingen et al. 2005) van Tellingen A, Schalkwijk CG, Teerlink T, Barto R, Grooteman MPC, van der Ploeg T, ter Wee PM, Nubé MJ. 2005. Influence of Different Haemodialysis Modalities on AGE Peptide Levels: Intradialytic versus Long-Term Results. *Nephron Clinical Practice*, 100(1):c1-7.
- (Vlassara Palace 2002) Vlassara H, Palace MR. 2002. Diabetes and advanced glycation endproducts. *JIM*, 251(2):87-101.
- (Vlassara Palace 2003) Vlassara H, Palace MR. 2003. Glycoxidation: the menace of diabetes and aging. *The Mount Sinai journal of medicine*, New York 70(4):232-241.

- (Weinreich 1998) Weinreich T. 1998. Prevention of renal osteodystrophy in peritoneal dialysis. *Kidney international*, 54(6):2226-2233.
- (Weiss 2006) Weiss C. 2006. Immunhistochemischer Nachweis der Advanced Glycation End-Products (AGEs) Nε-Carboxymethyllysine (CML) und Imidazolone im Knochengewebe differenter metabolischer Osteopathien [Dissertation]. Jena: Friedrich Schiller Universität.
- (Wendt et al. 2003) Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, Arnold B, Nawroth PP, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM. 2003. Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *JASN*, 14(5):1383-1395.
- (Yan et al. 1994) Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *JBC*, 269(13):9889-9897
- (Yonekura et al. 2003) Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. 2003. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *BJ*, 370(Pt 3):1097-1109.
- (Zhou et al. 2008) Zhou Z, Han JY, Xi CX, Xie JX, Feng X, Wang CY et al. 2008. HMGB1 regulates RANKL-induced osteoclastogenesis in a manner dependent on RAGE. *JBM*, 23(7):1084-1096.

Anleitungen und Vorschriften

Kalteinbettung

Geeignet für Immunhistochemie

Ausgang ist acetonfixiertes Material (z.B. Beckenkammbiopsie)

1h neues Aceton

1h Xylol

1h Xylol

1h Xylol/Technovit-Basislösung entstabilisiert 1:1

1h Basislösung entstabilisiert + Härter 1

Infiltrationslösung 4-8 Tage im Exikator bei 4°C



Polymerisation 2 Tage im Tiefkühlschrank bei -7°C



Aufblocken zum Schneiden

Objektträgerbeschichtung

2 Volumenteile Ponallösung (2% in bidest)

1 Volumenteil Poly-L-Lysin (0,01%)

- Objektträger (Superfrost-Plus) 10min in Lösung stellen

- Abtropfen

- stehend bei Raumtemperatur trocknen lassen

- Ponal- Poly-L-Lysin-Gemisch im Kühlschrank aufbewahren, vor Gebrauch aufschütteln

Poly-L-Lysin

Firma Sigma,

Sigma Diagnostics Inc P8920

Ponal-express (Holzleim, Verschluss schwarz/orange)

Firma Henkel

Aminoethylcarbazol [AEC] (Färbesubstrat):

Aminoethylcarbazol, Sigma A5754

In 1ml Eppendorfgefäße jeweils 4mg AEC abwiegen

Stammlösungen:

0,1M Natriumacetat: 4,1g Natriumacetat in 500ml Aqua dest. Lösen

0,1M Essigsäure: 572µl 100% Essigsäure + 100ml Aqua dest.

Substrat ansetzen:

1. 4mg AEC in 500µl Dimethylformamid lösen
2. 2,1ml 0,1M Essigsäure mit 7,9ml 0,1M Natriumacetat mischen
3. Davon 500µl verwerfen und das gelöste AEC hinzugeben und mischen (gelbliche Farbe, ergibt 2 Phasen)
4. Lösung mit Mikrofilter filtrieren (Porengröße 0,45µm reicht), die Farbe der Lösung ist klar
5. Diese Lösung **lichtgeschützt** aufbewahren **und kurz vor der Färbung 5µl 30% Wasserstoffperoxid hinzugeben!**
6. Die Lösung auf die Schnitte pipettieren, die Zeit liegt zwischen 5 und 15min, unter dem Mikroskop kontrollieren.

PBS-Puffer für die Immunhistochemie

Als Stammlösung 10x PBS herstellen:

Kaliumchlorid 2g

KH₂PO₄ 2g

NaCl 80g

Na₂HPO₄ x 7 H₂O 21,6g **oder** Na₂HPO₄ x 2 H₂O 12g

In 1l Aqua dest. Lösen, pH 7,4 (7,2-7,4)

Beim Herstellen von Verdünnungen (1 x PBS) pH kontrollieren → 1:10 verdünnen, d.h.

1Teil Stammlösung + 8 Teile Aqua dest.

Immunhistochemie mit CML- und Imidazolon-Antikörpern

Ponal- beschichteter- Superfrost- Plus- Objektträger mit Biopsie über Nacht gepresst



1. Tag: Entplastung (Feuchte Kammer vorbereiten)
4× 15 min in 2-Methoxy-ethyl-acetat (I, II, III, IV) ;
(1. Acetatbehältnis hat 30- 50 Schnitte)



Rehydrierung mit Absteigender Alkoholreihe (96%, 96%, 80%, 70% Ethanol) je 2min



5× spülen Aqua dest.



Entkalken 3 min 3% Essigsäure



5× spülen PBS/ TRIS – Puffer (danach in vorbereitete Feuchte Kammer)



mit Dakopen umranden



Deaktivierung der endogenen Peroxidase mit 3% H₂O₂ (Herstellung: 1800µl Puffer(PBS) +
200µl H₂O₂ , danach vortexen) 10min bei Raumtemperatur



mit PBS spülen



20 min Normalserum(2 Tropfen, Rabbit Kit), nur abgekippt NICHT spülen



Primärantikörper über Nacht bei 4°C

Herstellung: CML vortexen

Basisverdünnung: 1:1000

(2µl Ak : 1998µl PBS, sterile Spitze für Ak verwenden)
zentrifugieren

Rechenbeispiel:

Basisverdünnung CML 1: 1000

× 30	×50	×70	×100
10µl Ak +290µl PBS	6µl Ak +294µl PBS	2µl Ak +138µl PBS	2µl Ak +198µl PBS
vortexen und zentrifugieren			
Verdünnung auf Objektträger schreiben			
für Kontrolle: BSA			

2.Tag: 1. Spülen PBS/ TRIS – Puffer



15min:4 Tropfen Avidin + 1ml FCS (FCS 20%)



Spülen PBS/ TRIS – Puffer



15min:4 Tropfen Biotin + 1ml FCS (FCS 20%)

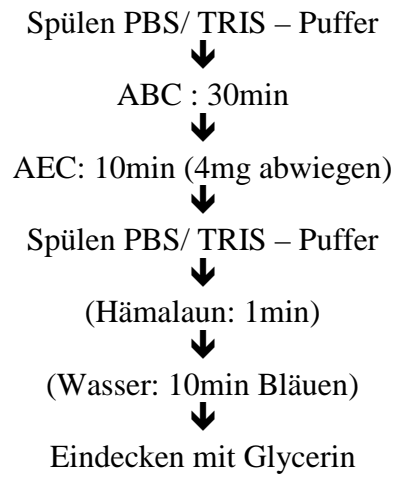


Spülen PBS/ TRIS – Puffer



sek. Ak: 30min (kleine gelbe Flasche fürs Ansetzen nehmen)
zusammen mit ABC- Reagenz ansetzen





Sek. Ak (blue kit) und ABC Reagenz nur 1d verwendbar

Danksagung

Ich möchte mich insbesondere bei Herrn Prof. Dr. med. G. Stein für die Vergabe des Themas und die hervorragende und geduldige Betreuung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Frau Priv.-Doz. Dr.med. G. Lehmann für die wertvollen Korrekturen und motivierenden Hinweise.

Ich danke weiterhin Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. S. Franke für die Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen.

Auch danken möchte ich den Medizinisch-Technischen Assistentinnen Frau G. Grunert und Frau W. Palm.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann und meiner Schwester, die mir mit ihrer Unterstützung die Fertigstellung der Arbeit ermöglicht haben.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. Stein, Frau PD OÄ Dr. med. G. Lehmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Radebeul, den 28.12.2010

Anne Roßner